

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden auf
parodontalpathogene Keime - eine in-vitro-Studie im
Biofilmmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Veronika Wechsler

aus Lindau

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Rainer Haas
Prof. Dr. Ekaterini Paschos

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Krankheitsbild der Parodontitis	6
1.2	Epidemiologie	6
1.3	Ätiologie	7
1.4	Pathogenese	8
1.4.1	Plaqueeentstehung und die beteiligten Bakterien	9
1.4.2	Bakterienkomplexe und ihre Virulenzfaktoren	10
1.4.3	Wirtsantwort auf Bakterien	11
1.4.4	Immunologische Komponenten	13
1.5	Antimikrobielle Peptide	14
1.5.1	Wirkungsmechanismus	14
1.5.2	Einteilung der antimikrobiellen Peptide (AMPs)	15
1.5.2.1	Cathelicidine	15
1.5.2.2	Defensine	17
1.5.2.2.1	α -Defensine	17
1.5.2.2.2	β -Defensine	18
1.6	AMP-Wirkung auf Bakterien in der Mundhöhle	20
2	Fragestellung und Zielsetzung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Verwendete Mikroorganismen	25
3.2	Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien	25
3.2.1	Aufbau der anaeroben Werkbank	26
3.2.2	Herstellung der Medien	27
3.2.3	Anzucht der Bakterien und Kulturbedingungen	28
3.3	Stammerhaltung	32
3.4	Biofilmmedium und Biofilmanzucht	32
3.5	Sensibilitätstestung der Bakterien gegenüber AMPs	33
3.5.1	alamarBlue®-Assay	35
3.6	Statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Deskriptive Auswertung	37
4.2	Statistische Datendarstellung	45

5	Diskussion.....	50
6	Zusammenfassung	56
7	Literaturverzeichnis.....	58
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
9	Abkürzungen	74
10	Herstellungsanweisungen der Medien	75
11	Danksagung	84

1 Einleitung

Trotz des steigenden Bewusstseins in den vergangenen Jahren für schöne und gesunden Zähne und Verbesserungen des Zahn- und Mundhygieneverhaltens, spielt Parodontitis in der heutigen Zeit eine immer größere Rolle mit steigenden Fallzahlen (Micheelis, 2006). Daher ist das frühzeitige Erkennen, bessere und genauere Diagnostik und eine individuell an den Patienten angepasste effektive Behandlung ausschlaggebend für die Entwicklung der Prävalenz der Erkrankung.

Es gibt zwar verschiedene Indexsysteme wie z.B. den CPI (Community Periodontal Index) zur Beurteilung der parodontalen Situation, jedoch fehlt bisweilen in der nationalen und internationalen Literatur eine einheitliche Einteilung der Erkrankung in Schweregrade (Micheelis *et al.*, 2008). Auch die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG Paro) führte keine Unterscheidung zwischen leichter und schwerer Parodontitis in der Parodontitis Diagnostik ein (Wiebe und Putnins, 2000). Somit ist ein Vergleich zwischen den Indizes nur schwer möglich und der Behandlungsbedarf und die Therapie von der Interpretation des jeweiligen Zahnarztes abhängig. Daher ist es von Nöten, dem Praktiker zusätzliche diagnostische Hilfsmittel und therapeutische Möglichkeiten an die Hand zu geben.

Die Kontrolle der auslösenden parodontopathogenen Bakterien ist ein entscheidender Schritt in der Therapie der Parodontitis. Da es sich bei der Parodontitis um eine Biofilm-assoziierte Erkrankung handelt, ist es nur sehr schwer möglich mit antimikrobiellen Mitteln eine Bakterienreduktion zu erreichen, da die Substanzen nicht den Wirkungsort erreichen (Mah und O'Toole, 2001). Ein vielversprechender Ansatzpunkt sind endogene Antibiotika wie antimikrobielle Peptide (AMPs). Diese Peptide wurden in vielen Lebensformen vom Bakterium bis hin zum Menschen gefunden und stellen einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, den eigenen Organismus gegen aggressive Eindringlinge zu schützen (Ganz *et al.*, 1995; Ganz *et al.*, 1997; Lehrer *et al.*, 1999). Inzwischen wurden weit mehr als 100 unterschiedliche Moleküle beschrieben. Antimikrobielle Peptide von Vertebraten werden von Abwehrzellen, wie Makrophagen oder Granulozyten und insbesondere von Epithelzellen und Osteoblasten exprimiert (Horibe *et al.*, 2013). Die Mundhöhle ist der Wohnsitz von einer Vielzahl von AMPs, welche von Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten und Speicheldrüsen ausgeschüttet werden. Eine Verminderung der Aktivität antimikrobieller Peptide kann

zu Krankheiten führen, welche mit einer Immunschwäche einhergehen (Bals *et al.*, 2000).

Um ein besseres Verständnis für die Wirkung und Funktion von antimikrobiellen Peptiden zu bekommen, soll in dieser Arbeit die Sensibilität von parodontopathogenen Bakterien im Biofilm auf AMPs untersucht werden.

1.1 Krankheitsbild der Parodontitis

Parodontitis ist eine bakterielle Infektionskrankheit mit multiplen ätiologischen Faktoren, welcher oft eine oberflächliche Entzündung der Gingiva vorausgeht (Rateitschak *et al.*, 2003). Zu den auslösenden Faktoren zählen eine verringerte Immunabwehr, das Vorhandensein von Risikofaktoren auf Seiten des Patienten sowie eine Infektion mit parodontopathogenen Bakterien. Sie kann alle Teile des Zahnhalteapparats betreffen, mit fortschreitendem Verlust des Stützgewebes und Knochens und somit im weiteren Verlauf zu Zahnlockerung und Zahnverlust führen (Rateitschak *et al.*, 2003).

1.2 Epidemiologie

Parodontitis ist die häufigste chronische Entzündung beim Erwachsenen (Li *et al.*, 2000; Marsh, 2003) und weltweit verbreitet. Die subjektive Lebensqualität kann insbesondere durch die Krankheitsfolgen beeinträchtigt sein. In Deutschland konnte von 1997 bis 2005 eine Zunahme an Neuerkrankungen von 26,9% verzeichnet werden. In der Altersgruppe der 35- bis 44-Jährigen leiden 52,7% an einer mittelschweren und 20,5% an einer schweren Form der Parodontitis (Schützhold *et al.*, 2013). Diese Zunahme beobachten auch andere Studien mit dem Ergebnis, dass mindestens 50% der Erwachsenen an einer Form der Parodontitis leiden (Morris *et al.*, 2001; König *et al.*, 2010). Eine mittelschwere Parodontitis wird definiert durch Zahnfleischtaschen von mehr als 4 bis 5 mm (CPI-Index Grad 3) und eine schwere Parodontitis wird definiert durch Taschentiefe von 6 mm oder mehr (CPI-Index Grad 4) (Micheelis, 2011). Bei den Senioren über 65 sind fast die Hälfte von einer mittelschweren und 38,9% von einer schweren Ausprägung der Erkrankung betroffen.

Dennoch haben Patienten im höheren Lebensalter eine höhere Anzahl an verbleibenden Zähnen als früher. 1997 fehlten einem 65- bis 74-jährigen Senioren im Durchschnitt 17,6 Zähne. Dieser Wert ist bis 2005 auf 14,2 Zähne gesunken (Micheelis

und Schiffer, 2006). Dies liegt zum einen an der konservativeren Zahnbehandlung und zum anderen an der verbesserten Prophylaxe in Form von professionellen Zahnreinigungen und der massiven Fluoridierung durch Zahnpasta und Speisesalz. Daraus resultiert jedoch, dass die erhaltenen Zähne mit zunehmendem Lebensalter eine steigende Prävalenz für parodontale Erkrankungen aufweisen. Somit ist Parodontitis heutzutage einer der Hauptgrund für Zahnverlust und betrifft mehr als 300 Millionen Menschen weltweit (Socransky *et al.*, 1998). Nicht nur das Lebensalter, sondern auch Konsumgewohnheiten und Sozialstatus beeinflussen das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken. Ein Raucher mit einfacher Schulausbildung hat zum Beispiel ein um den Faktor 3,3 erhöhtes Risiko an einer schweren Ausprägung der Parodontitis zu erkranken (Micheelis, 2006). In den letzten Jahren wurde auch vermehrt ein Zusammenhang zwischen Bakterien des Mundraums und systemischen Erkrankungen, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Komplikationen während der Schwangerschaft und niedriges Geburtsgewicht beobachtet (Beck und Offenbacher, 2005; Xiong *et al.*, 2006; *et al.*, 2000; Marsh, 2003). Daher ist es auch im Sinne der Wirtschaftlichkeit des Gesundheitssystems die Erkrankung der Parodontitis durch Präventionsmaßnahmen und verbesserte Diagnostik und Therapie zu verhindern bzw. ihr Fortschreiten zu unterbinden.

1.3 Ätiologie

Parodontitis ist eine chronische entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats und umliegender Gewebe mit multifaktorieller Genese. Sie ist durch Gewebsverlust und Attachmentverlust gekennzeichnet und wird durch parodontopathogene Mikroorganismen und vor allem deren Bestandteile und Produkte im subgingivalen Biofilm sowie die Reaktion des Immunsystems darauf verursacht (Marsh, 2005; Rateitschak *et al.*, 2003). Dabei können parodontopathogene Mikroorganismen die Entstehung und Progression einer Parodontitis induzieren, indem sie in die Wirtsabwehr eingreifen, sie umgehen, unterdrücken oder eine überschießende Wirtsantwort hervorrufen (Page und Kornmann, 1997). Allerdings ist dieser primär ätiologische Faktor nicht ausschlaggebend für die Entwicklung einer Gingivitis in eine Parodontitis (Rateitschak *et al.*, 2003). Bei der Parodontitis handelt es sich vielmehr um eine komplexe Erkrankung, für die zusätzlich zu den pathogenen Mikroorganismen weitere Risikofaktoren eine Rolle spielen. Diese können in primäre, sekundäre nichtveränderbare und veränderbare Risikofaktoren unterteilt werden, wobei spezifische Pathogene in der Plaque, wie z.B. *Aggregatibacter*

actinomycescomitans und *Porphyromonas gingivalis* zu den primären Risikofaktoren gezählt werden (Aberg *et al.*, 2015; Clarke und Hirsch 1995; Slots *et al.*, 1986). Unter die Kategorie der sekundären Risikofaktoren zählen u.a. genetische Disposition, ethnische Zugehörigkeit, Geschlecht und Alter. Alkohol- und Nikotinkonsum, (Hyman und Reid, 2003) Medikamente, das soziale Umfeld und psychischer Stress (Van Dyke und Sheilesh, 2005) sind weitere Ursachen, die das Erkrankungsrisiko begünstigen.

1.4 Pathogenese

Parodontitis kann sich aus einer mehr oder weniger ausgeprägten Form der Gingivitis entwickeln, es besteht aber auch die Möglichkeit unabhängig von dieser zu entstehen (Sheiham *et al.*, 2002). Zunächst kommt es zu einer Anhäufung eines hoch organisierten Biofilms auf den Zähnen und dem Zahnfleisch, der eine Schutzfunktion sowohl gegen antimikrobielle Substanzen, als auch vor Phagozytose durch wirtseigene Abwehrzellen aufweist (Gorr, 2009; Marsh, 2005). Die in der Plaque enthaltenen Bakterien sind durch eine extrazelluläre Polysaccharidschicht geschützt (Khouri *et al.*, 1992). Sofern die Plaqueschicht nicht durch Abschilferung oder Reinigungsmaßnahmen entfernt wird, kommt es in den folgenden Tagen zu einer Entzündung des Zahnfleischs. Das Immunsystem wird aktiviert und polymorphkernige Granulozyten (PMN) durchwandern vermehrt das Saumepithel und bilden einen Wall gegen die Plaquebakterien. Subepithelial tritt zunächst ein Lymphozyteninfiltrat auf und im Bereich des Zahnfleischs sind erste sichtbare Veränderungen zu beobachten. Das Saumepithel proliferiert im koronalen Bereich nach lateral. Diese, als „frühe Gingivitis“ bezeichnete Entzündung ist reversibel und tritt 8-14 Tage nach vermehrter Plaqueakkumulation auf. Weitere drei Wochen später ist das Stadium der etablierten Gingivitis erreicht. Dieses kann über Jahre bestehen ohne sich weiter in eine Parodontitis zu entwickeln (Page und Schröder, 1976). Es kennzeichnet sich durch eine stärkere Auflockerung und Proliferation des Saumepithels nach lateral, bedingt durch den Strom der Sulkusflüssigkeit und der Zunahme an PMN (Rateitschak *et al.*, 2003). Außerdem bilden sich gingivale Taschen oder sogenannte Pseudotaschen aus. Trotz zunehmenden Kollagenverlust und Fibroblastenschädigung (Seymour *et al.*, 1983) besteht in diesem Stadium noch kein bindegewebiger Attachmentverlust (Rateitschak *et al.*, 2003). Plasmazellen und Immunglobuline sind im Bindegewebe mikroskopisch bzw. immunhistochemisch zu erkennen. Bis heute sind die Gründe für eine Tiefeninvasion der Bakterien nicht

bekannt. Hat sich eine Parodontitis manifestiert, zeichnet sich diese durch Perioden der Stagnation und Exazerbation aus, die je nach Form langsam oder schnell verlaufen können (Rateitschak *et al.*, 2003). Das Saumepithel wandelt sich in ein Taschenepithel um, welches nach apikal und lateral proliferiert. Es entsteht eine Tasche, welche ein Schlupfwinkel und Reservoir für pathogene Bakterien, die die Parodontitis unterhalten, darstellt (Nishihara *et al.*, 2004; Rateitschak *et al.*, 2003). Es kommt zu wachsenden Kollagenverlusten im entzündeten Gewebe und somit zu einem bindegewebigen Attachmentverlust und Knochenabbau. Bei starker Ausprägung der Erkrankung kann es zu bakteriellen Invasion des Gewebes und zu Mikro- und Makroabszessen kommen (Page und Schroeder, 1976). Sobald ein Gewebsverlust festzustellen ist, ist lediglich das Ausheilen der Entzündung möglich. Eine vollständige Geweberegeneration im Sinne einer restitutio ad integrum kann nur sehr schwer erreicht werden.

1.4.1 Plaqueentstehung und die beteiligten Bakterien

Damit Plaque entstehen kann, müssen sich zunächst auf der Pellikel des Zahnes bakterielle Populationen ansammeln. Diese sind in ihrer selbst produzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingeschlossen und können somit an Oberflächen und Grenzflächen anheften (Costerton *et al.*, 2005; Wimpenny *et al.*, 2000). Die Pellikel, auch sekundäres Schmelzoberhäutchen genannt, besteht aus Proteinen und Glykoproteinen des Speichels, welcher sich auf einer gesäuberten Zahnoberfläche innerhalb von Minuten bildet (Hellwig *et al.*, 2003; Rateitschak *et al.*, 2003). Insgesamt befinden sich im Mundraum mehr als 700 verschiedene Bakterienspezies (Gorr, 2009). Ungefähr 415 verschiedene Spezies wurden bisher in der subgingivalen Plaque gefunden (Paster *et al.*, 2001), jedoch nur eine relativ kleine Anzahl an Spezies werden mit einer parodontalen Erkrankung in Verbindung gebracht (Consensus report, 1996). Zu Beginn der Besiedlung überwiegen orale Streptokokken, denen sodann Aktinomyzeten und Veillonellen folgen. Diese Bakterienarten fallen unter die Rubrik der frühen Besiedler der Plaque und ermöglichen die Etablierung weiterer Keime. Zu den Spätbesiedlern zählen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Fusobacterium nucleatum* stellt den Vermittlerkeim zwischen den frühen und späten Plaquebesiedlern dar und liefert u.a. durch seine Stoffwechselprodukte den parodontopathogenen Mikroorganismen ideale Bedingungen zur Vermehrung und Entwicklung des Biofilms (Kolenbrander *et al.*,

1993; Kolenbrander *et al.*, 2002). Die parodontopathogenen Bakterien werden hauptsächlich in der Sulkusflüssigkeit und in den Taschen sowohl beim Gesunden als auch beim Erkrankten gefunden (Colombo *et al.*, 2006; Teles *et al.*, 2006), allerdings bei Letzteren in höheren Mengen (10^5 -Fach) (Lovegrove *et al.*, 2004).

Als besonders weichgewebszerstörend haben sich die Bakterienarten *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* und *T. denticola* herausgestellt, weshalb diese auch als die fünf Leitkeime der Parodontitis bezeichnet werden (Consensus report, 1996). Es entstehen Mikrokolonien, meist gramnegativer Bakterien, die sich im Biofilm zu Komplexen gruppieren und untereinander Stoffwechselprodukte, Resistenz- und Virulenzfaktoren austauschen (Rateitschak *et al.*, 2003; Socransky und Haffajee, 2005). Dadurch ist das Plaquewachstum gesichert und die Bakterien sind von der Wirtsabwehr und zugeführten Bakteriziden weitestgehend geschützt.

1.4.2 Bakterienkomplexe und ihre Virulenzfaktoren

Mikrobiologische Untersuchungen der subgingivalen Plaque ergaben, dass bestimmte parodontopathogene Mikroorganismen in Komplexen anzutreffen sind. Daraufhin fasste Socransky und Kollegen (Socransky *et al.*, 1998) die jeweils in einem engen Zusammenhang stehenden Bakterien zu sechs Komplexen zusammen, die entsprechend ihrer Pathogenität farblich unterschiedlich kodiert wurden. Für die Entwicklung einer Parodontitis ist besonders der rote und orange Komplex von Interesse. Der rote Komplex umfasst die mit einer Parodontitis stark assoziierten Bakterien *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* (Holt *et al.*, 2005). Im orangefarbenen Komplex sind dagegen die Vermittlerkeime wie *F. nucleatum* und *P. intermedia* zusammengefasst. Diese stehen in engem Kontakt mit dem roten Komplex und treten vermehrt bei zunehmenden Sondierungstiefen auf. Daneben existiert das Bakterium *A. actinomycetemcomitans*, welches ein bewegliches, fakultativ anaerobes gramnegatives Stäbchen ist. Parodontalpathogene Spezies weisen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren auf (Socransky, 1979; Henderson *et al.*, 2003). So besitzt *A. actinomycetemcomitans* zum Beispiel die Fähigkeit, Leukotoxin zu produzieren, welches in hoher Konzentration bei Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur Porenbildung und dadurch zur Zelllyse führt (Henderson *et al.*, 2003; Tsai *et al.*).

1979; Taichman *et al.*, 1980; Zambon *et al.*, 1983). *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* produzieren eine Vielzahl von Proteasen (Holt *et al.*, 2005). Bei *P. gingivalis* handelt es sich um ein anaerobes, gramnegatives, nicht sporenbildende Stäbchen, welches zum Beispiel Cysteinproteasen (Gingipaine) synthetisiert. Diese ermöglichen eine vereinfachte Nahrungsbereitstellung und eine Invasion ins parodontale Gewebe. Darüber hinaus beeinflussen Gingipaine in hohem Maße die Wirtsabwehr, indem sie z.B. *P. gingivalis* vor AMPs schützen und die Konzentration von Serum- und Gewebsproteinen, wie z.B. Interleukin-8 herabsetzen (Guo *et al.*, 2010; Karim *et al.*, 2010). Schwere Formen der Parodontitis können durch die Anwesenheit des hochpathogenen Bakteriums *P. gingivalis* charakterisiert werden, welcher die Progression der Erkrankung vorantreibt (Sixou, 2003). Das Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* wurde vor allem bei jüngeren Menschen beobachtet, wo ein großer Knochenverlust zu verzeichnen war. *P. gingivalis* hingegen wird mit älteren Patienten und chronischen Verlaufsformen assoziiert (Slots und Ting, 1999).

T. denticola wirkt zytotoxisch und ist hoch beweglich (Ishihara *et al.*, 2010). Durch seine enzymatische, chymotrypsin- bzw. trypsinähnliche Aktivität kann es Ester, Amide und Peptide spalten, was wiederum seine parodontopathogene Leistung unterstützt (Ohta *et al.*, 1986; Uitto *et al.*, 1988).

Über die Virulenzfaktoren von *T. forsythia* ist bisher wenig bekannt. 2010 wurde allerdings eine Protease beschrieben, die in der Lage ist, Bindegewebe abzubauen und LL-37, ein antimikrobielles Peptid (AMP), zu spalten (Koziel *et al.*, 2010).

1.4.3 Wirtsantwort auf Bakterien

Die Reaktion des Wirts auf Plaque kann in vier Stadien eingeteilt werden. Zunächst einmal reagiert das gesunde Parodont auf die von den Plaquebakterien in großen Mengen freigesetzten Metabolite. So kommt es durch die Freisetzung von Fettsäuren wie Butter- und Propionsäure und Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS), welche durch das Saumepithel in das parodontale Bindegewebe diffundieren, zu einer gingivalen Entzündung (Wilson *et al.*, 1996). Die Zellen des Saumepithels reagieren daraufhin mit einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukin-8 (IL-8), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), und Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), welche zusammen mit den Mediatoren bakterieller Herkunft in das parodontale Gewebe diffundieren (Abe *et al.*, 1991). Die lokale Gefäßreaktion wird durch Freisetzung von Neuropeptiden und Histamin in Gang gesetzt. Histamin

wiederum setzt IL-8 frei, welches PMN anlockt. Dadurch entsteht ein chemotaktisch wirksames Konzentrationsgefälle, anhand welchem Leukozyten auf dem Weg aus den Gefäßen zu der Plaque wandern können (Stadium 1) (Kornman *et al.*, 1997). Im zweiten Stadium (Stadium 2) kommt es zur ersten akuten lokalen Entzündungsreaktion. Es etabliert sich ein Zusammenspiel von Mediatoren, zugewanderten Immunzellen und ansässigen Zellen, welche alle zum Ziel haben das Gewebsgleichgewicht so lange wie möglich aufrechtzuerhalten und somit Gewebsverluste zu verhindern. Dabei werden Makrophagen und Serumproteinsysteme aktiviert, die in das Bindegewebe übertreten und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Im Verlauf werden Leukozyten und Monozyten rekrutiert und Entzündungsmediatoren von den Makrophagen produziert, wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12) und TNF- α (Rateitschak *et al.*, 2003). Die Entzündung wird hochreguliert und es bilden sich Zellinfiltrate (Stadium 3), welche von Lymphozyten dominiert werden. Aktivierte T-Lymphozyten koordinieren die Immunantwort mittels Zytokinen und B-Zellen differenzieren zu Antikörper produzierenden Plasmazellen und bilden Immunglobuline (Ebersole *et al.*, 1993). Auch PMNs schütten Zytokine aus und aktivierte Fibroblasten produzieren statt Kollagen MMPs und TIMP (tissue inhibitors of MMP). Erst im letzten Stadium (Stadium 4) sind erste Attachmentverluste zu verzeichnen. Die Immunabwehr ist nicht mehr in der Lage den durch pathogene Mikroorganismen über längere Zeit ausgeübten Druck stand zu halten. Die Gewebesbalance verschiebt sich in Richtung vermehrten Abbaus von Kollagen, Matrix und Knochen. Attachmentverlust ist das Resultat einer aktiven Phase der Parodontitis. Das Gleichgewicht zwischen An- und Abbau ist gestört und es kommt zur vermehrten Auflösung von Extrazellulärmatrix und Kollagen. Ausschlaggebend für den Abbau von Bindegewebs- und Knochenmatrix sind die Makrophagen, die von bakteriellen Metaboliten wie LPS aktiviert werden und Fibroblasten zur Sekretion von abbaufördernden Mediatoren wie Prostaglandin E₂ veranlassen. Diese sind für die vermehrte Freisetzung von MMP zuständig. Speziell die Matrix-Metallo-Proteinase-8 (MMP-8) ist durch ihre kollagenolytische Wirkung maßgeblich für die Vermittlung des desmodontalen Kollagenabbaus verantwortlich (Kinane *et al.*, 2003). Diese Faktoren wiederum stimulieren die Osteoklasten und hemmen die Osteoblastentätigkeit (Schwartz *et al.*, 1997).

1.4.4 Immunologische Komponenten

Das Immunsystem lässt sich in angeborene und erworbene Immunmechanismen aufteilen. Das angeborene, unspezifische Immunsystem besitzt ein Organismus von Geburt an. Darunter fallen in den zellulären Teil, die Haut und die Magensäure, die als physikalisch-chemische Hindernisse dienen und somit ein Eindringen in unseren Körper erschweren (Thomas, 2012). Zellen des angeborenen Immunsystems können durch Phagozytose Mikroorganismen aufnehmen und diese vernichten. Zu den Phagozyten zählen Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Rateitschak *et al.*, 2003). In die Kategorie der humoralen Immunabwehr des angeborenen Immunsystems zählen das Komplementsystem und Enzyme wie Lysozym, Peroxidasen, Lactoferrine welche unter anderem in verschiedenen Körpersekreten wie zum Beispiel der Tränenflüssigkeit und im Speichel enthalten sind (Kirkpatrick und Miller, 2013). Neben den antimikrobiell wirkenden Enzymen spielen besonders auch die Sekretion antimikrobieller Peptide (AMP) in der Mundhöhle eine bedeutende Rolle in der Abwehrfunktion pathogener Keime (McCrudden *et al.*, 2013). So helfen die Enzyme und AMPs bei der Neutralisation bakterieller Bestandteile in der supra- und subgingivalen Plaque (Abiko *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2000; Bissell *et al.*, 2004). Neben ihrer ursprünglichen Abwehrfunktion haben AMPs die Aufgabe das adaptive Immunsystem zu regulieren (Fearon und Locksley, 1996; Matzinger, 1998; Medzhitov und Janeway, 1997).

Das adaptive Immunsystem kann spezifische körperfremde Strukturen erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen in Gang setzen und Antikörper bilden (Na *et al.*, 2014). Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC) stellen die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunabwehr dar. Die Aufgabe der T-Lymphozyten ist es die zellvermittelte Immunantwort und B-Lymphozyten zu unterstützen. Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie können bei Antigenkontakt unter Zuhilfenahme von T_H1 und T_H2-Zellen zu Plasmazellen proliferieren und Antikörper bilden (Thomas, 2012; Rateitschak *et al.*, 2003). Die Bildung von Gedächtniszellen ermöglicht es bei einem erneuten Kontakt mit dem Krankheitserreger innerhalb kürzester Zeit eine angemessene Abwehrreaktion in Gang zu setzen (Teixeiro *et al.*, 2009). Im Speichel werden die Antikörper, IgAs in der Mukosa gebildet und können als Dimer die Lamina epithelialis durchqueren und sich in den Schleimhäuten umgebenden

Muzinen wiederfinden. Durch diesen Schutz kann sich der Körper vor pathogenen Mikroorganismen und Neuinfektionen schützen.

1.5 Antimikrobielle Peptide

Als besonderer Bestandteil des angeborenen Immunsystems soll im Weiteren genauer auf die AMPs eingegangen werden.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kleine Peptidmoleküle, welche eine Größe unter 50 Aminosäuren aufweisen. Sie werden von individuellen Genen kodiert und sind zum Großteil kationisch (Wang, 2007). Ihre Syntheseorte können Pflanzen, Bakterien, Insekten, wirbellose Tiere und Vertebraten sein. Als Bestandteil der angeborenen unspezifischen Immunabwehr (Bals, 2000) weisen sie nicht nur eine antimikrobielle Funktion auf, sondern ihnen kommt auch eine Aufgabe bei der Regulation der Immunantwort zu (Doss *et al.*, 2010).

1.5.1 Wirkungsmechanismus

Das antimikrobielle Wirkungsspektrum von AMPs umfasst sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien, Pilze und lipidumhüllte Viren (Bals, 2000). Aufgrund ihrer amphipathischen Struktur, dem Auftreten von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in bestimmten Bereichen der Peptidkette, können AMPs mit bakteriellen Membranen wechselwirken (Hancock und Diamond, 2000). Eine Studie von Rosenfeld und Mitarbeitern zeigte, dass AMPs in gramnegativen Bakterien an die negativ geladenen Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Bakterienmembran binden (Rosenfeld *et al.*, 2006; Mookherjee *et al.*, 2006; Kandler *et al.*, 2006) und so zur Zytoplasmamembran oder in den periplasmatischen Raum vordringen (Falla *et al.*, 1996). In grampositiven Bakterien binden AMPs an Polysaccharide und an membranreiche Phospholipide, wie eine Studie von Weinberg und Kollegen zeigte (Weinberg *et al.*, 1998). Des Weiteren weisen AMPs eine neutralisierende Wirkung auf LPS auf, was eine Reduzierung der Endotoxinwirkung zur Folge hat (Falla *et al.*, 1996; Piers *et al.*, 1994).

AMPs mit einer α -helikalen Struktur binden mit ihrem hydrophoben Anteil der Helix an die Lipid-Doppelmembran und zerstören so das Bakterium durch Porenbildung (Zasloff, 2002; Brogden, 2005). Die Gruppe der Defensine kann ebenfalls Poren durch die Bakterienplasmamembran bilden, indem sie an die negativ geladenen Lipide der Membran binden. Die Porenbildung hat einen Ladungsaustausch sowie

einen Wasser- und Ionenstrom durch die Bakterienmembran zur Folge. Der Verlust des osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellularraum führt schließlich zum Abtöten des Bakteriums (Fujii *et al.*, 1993; Ganz, 2003).

1.5.2 Einteilung der antimikrobiellen Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Peptide können anhand ihres strukturellen Aufbaus in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Beim Menschen kommen Peptide der Defensin-Cathelicidin- und Histatinfamilie vor, wobei die beiden erst genannten Gruppen eine Schutzfunktion in der Mundhöhle gegen oralpathogene Mikroorganismen ausüben.

1.5.2.1 Cathelicidine

LL-37, oder auch hCAP-18 (Human Cationic Antimicrobial Peptide) genannt ist der einzige Vertreter dieser Gruppe beim Menschen (Heilborn *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2002). Neutrophile Granulozyten zählen zu der Hauptsekretionsquelle von LL-37, es wird jedoch auch in Makrophagen, Monozyten, Epithelzellen und Osteoblasten synthetisiert (Scott *et al.*, 2002; Frohm *et al.*, 1997; Gudmundsson *et al.*, 1996; Cowland *et al.*, 1995; Larrick *et al.*, 1995; Bals *et al.*, 1998; Horibe *et al.*, 2013) und wurde auch in den Speicheldrüsen, der Mundschleimhaut und im Zahnfleisch nachgewiesen (Murakami *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 1998).

LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren welche mit zwei Leucinaminosäuren beginnen (Tomasinsig und Zanetti, 2005). Cathelicidine werden als Präpropeptid synthetisiert und in den Granula von neutrophilen Granulozyten und anderen Zellen gespeichert. Das Präpropeptid besteht aus einem Signal-Peptid, einem N-terminalen Propeptid, auch Cathelin genannt und einer C-terminalen variablen Region, welche nach Abspaltung durch eine Serin-Protease, das eigentliche reife AMP darstellt (Tomasinsig und Zanetti, 2005; Zanetti, 2005). Das reife LL-37 ist ein amphipathisches lineares α -Helixpeptid mit einer Größe von 4-5 kDA. Der kodierende Abschnitt liegt auf Chromosom 3 (Brogden *et al.*, 2005). Seine antimikrobielle Aktivität richtet sich gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Zanetti, 2005). LL-37 wirkt als proinflammatorischer Trigger während einer Parodontitis. Neben seiner Wirkung als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Monozyten steigert es die Produktion von Leukotrienen (Wan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2000; Gorr, 2012) Diese proinflammatorische Reaktion kann zu einer Knochengewebezerstörung führen (Wan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2000; Börgeson *et al.*, 2011). Das Cathelicidin LL-37 spielt eine wichtige Rolle im

Bereich der Mundhöhle und kann Krankheiten verhindern. So kann es in Abwesenheit des antimikrobiellen Peptids zu Krankheiten, wie dem Kostmann oder Papillon-Lefèvre Syndrom kommen (Eick *et al.*, 2014; Pütsep *et al.*, 2002). Diese Patienten leiden an einer schweren, generalisierten und aggressiven Form der Parodontitis (Pütsep *et al.*, 2002; Carlsson *et al.*, 2006).

Die durchschnittliche Konzentration von LL-37 im gesamten Speichel beträgt 0,14-3 µg/ml und in der Sulkusflüssigkeit 0,5 µg/ml (Bachrach *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2005). Bei Patienten mit chronischer Parodontitis (Puklo *et al.*, 2008) oder einer Entzündung in der Mundhöhle sind die Werte von LL-37 erhöht (Dommisch *et al.*, 2009). 36% der Patienten mit aggressiver Parodontitis hingegen wiesen eine verminderte Konzentration von LL-37 in der Sulkusflüssigkeit auf (Puklo *et al.*, 2008). In einer Studie von Türkoglu und Kollegen wurde in der Sulkusflüssigkeit eine Konzentration von 0,3-0,7 µM bei gesunden Patienten und einer Konzentration von 0,7-1,8 µM bei Patienten mit chronischer Parodontitis gemessen (Türkoglu *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie wurde die Speichelkonzentration von LL-37 bei gesunden Patienten, Patienten mit chronischer Parodontitis und zahnlosen Patienten gemessen. Den höchsten Wert, mit 30,5 ng/ml wiesen die gesunden Patienten auf, chronisch Erkrankte hatten eine Konzentration von 22,5 ng/ml und Zahnlose eine Konzentration von 1,8 ng/ml (Davidopoulou *et al.*, 2013). Viele der antimikrobiellen Peptide werden posttranslational verarbeitet (Messana *et al.*, 2008; Ramachandran *et al.*, 2006) oder weisen Polymorphismen auf, die zu einer Variation in der Konzentration im Speichel führen können (Oppenheim *et al.*, 2007; Whitelegge *et al.*, 2007). Die hoch unterschiedlichen Messergebnisse können durch die unterschiedlichen Messmethoden und Entnahmetechniken erklärt werden.

In einer weiteren Studie wurde die Expression von mRNA des LL-37 nur im entzündeten Zahnfleisch und nicht im gesunden Zahnfleisch beobachtet. Diese Studie zeigt auch eine positive Korrelation zwischen der Taschentiefe eines an Parodontitis erkrankten Patienten und der Konzentration von LL-37, was wiederum anzeigt, dass die Expression von LL-37 mit dem Schweregrad der Parodontitis in Verbindung gebracht werden kann. Abbildung 1 zeigt die 3-dimensionale Struktur von LL-37.



Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur von LL-37 (Wang, 2008)

1.5.2.2 Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide mit einer Länge von 29-47 Aminosäuren und einem Gewicht von 3,5-4,5 kDa, die im Gegensatz zu Cathelicidinen β -Faltblattstruktur aufweisen und drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen. Die Anordnung der Disulfidbrücken kann variieren und lässt die Defensine in α - und β -Defensine unterteilen (Ganz und Lehrer, 1995). Beim Menschen sind derzeit sechs α -Defensine (Ganz, 1987; Quayle *et al.*, 1998; Jones und Bevins, 1993; Porter *et al.*, 1997) und vier β -Defensine bekannt (Ganz, 1987; Harder *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004; Mathews *et al.*, 1999) deren codierende Gene auf Chromosom 8 gruppiert liegen. Vertreter beider Gruppen sind sowohl im Speichel als auch in der Sulkusflüssigkeit nachweisbar (Gorr, 2009). Aufgrund der Anwesenheit von kationischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) besitzen Defensine bei neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung. Der dreidimensionale Aufbau ist für eine hydrophobe und eine hydrophile Seite verantwortlich (Hancock *et al.*, 1997). Diese Struktureigenschaften sind für den Wirkungsmechanismus wichtig.

1.5.2.2.1 α -Defensine

Bei den α -Defensinen wurden bisher drei verschiedene Unterformen, HNP-1 bis HNP-3 (Human neutrophil peptide) im Speichel nachgewiesen. Sie weisen eine Länge zwischen 29 und 35 Aminosäuren auf und befinden sich in ihrer aktiven Form in den primären Granula neutrophiler Granulozyten (Ganz und Lehrer, 1995). In Abbildung 2 wird die 3-dimensionale Struktur von HNP-3 gezeigt. Andere Syntheseorte dieser Peptide können auch B und T-Lymphozyten sein (Armitage, 1999; Gallo *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2005). Bevor sie in diesen gespeichert werden können, werden α -Defensine als Pre-pro-peptidsequenzen synthetisiert, bestehend aus einem „Precursor“-Molekül mit 90-100 Aminosäuren und einer N-terminalen Sequenz, einem anionischen Segment und einem C-terminalen reifen kationischen Defensin. Nach proteolytischer Spaltung des Vorläuferpeptids kann dieses gespeichert werden (Valore und Ganz, 1992). 1989 wurde zum ersten Mal von Lehrer und Kollegen, die Wirkung von HNP-1 gegen das Bakterium *Escherichia*

coli durch eine Permeabilitätserhöhung durch die äußere und innere Bakterienmembran demonstriert (Lehrer *et al.*, 1989). Die durchschnittliche Konzentration von HNP1-3 im Speichel, welche mit der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC/MS) gemessen wurde, beträgt 5,6 µg/ml (Goebel *et al.*, 2000) und bei Patienten mit chronischer Parodontitis beträgt die Konzentration in der Sulkusflüssigkeit 70 µg/ml (Lundy *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie wurde eine signifikant erhöhte HNP-1 Konzentration ($14,7 \pm 11,0$ µg/mL) bei Patienten mit einer oralen Entzündung festgestellt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Nach der Behandlung sank der Wert auf $0,8 \pm 0,7$ µg/ml ab und entsprach den Konzentrationen der gesunden Kontrollpersonen (Mizukawa *et al.*, 1999). Ebenso konnten in der Sulkusflüssigkeit zwei bis vierfach höhere HNP1-3 Werte bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (bzw. eine Hochregulierung um das 60-fache bei Patienten mit chronischer Parodontitis und um das 15-fache bei Patienten mit aggressiver Parodontitis) (Puklo *et al.*, 2008).

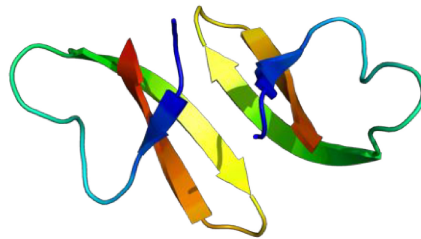


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur von HNP-3 (Hill *et al.*, 1991)

1.5.2.2.2 β-Defensine

Humane β-Defensine (HBD) sind kleine kationische und cysteinreiche antimikrobielle Peptide mit einer Größe von 3-5 kDa (Ganz, 1999). Sie sind in der Lage die Integrität von der Bakterienzellwand durch Porenbildung zu zerstören und die Produktion von Antigen-produzierenden Zellen (APC) gegen ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien zu stimulieren (Lu *et al.*, 2004; Abiko *et al.*, 2003; Schutte *et al.*, 2002; Lehrer und Ganz, 2002). Ihre Länge variiert zwischen 36 und 42 Aminosäuren (Zhao *et al.*, 1996). Die 3-dimensionale Struktur von HBD-2 wird aus Abbildung 3 ersichtlich. Sie werden insbesondere von Epithelzellen mehrerer Organe, wie der Haut, Lunge, Niere, Pankreas, aber auch der Nasen- und Mundschleimhaut produziert (Harder *et al.*, 2000). HBDs befinden sich des Weiteren im Zahnfleischepithel, in den Speicheldrüsen, im Speichel und in der

Sulkusflüssigkeit (Garcia *et al.*, 2001, Bensch *et al.*, 1995). Bisher wurden nur HBD1-3 im menschlichen Zahnfleischepithel nachgewiesen (Dunsche *et al.*, 2002; Saitoh *et al.*, 2004). Die verschiedenen HBDs können über unterschiedliche Mechanismen die unterschiedlichen Spezies der Mundhöhlenbakterien abtöten (Diamond *et al.*, 2009). HBD-2 unterdrückt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, aktiviert und degranuliert Mastzellen, reguliert das Komplementsystem und steigert die Antigen-spezifische Immunantwort (Porter *et al.*, 1997).

Bei Patienten mit Parodontitis wird die Expression von HBDs in Zahnfleischepithelzellen von den parodontopathogenen Keimen reguliert (Vankeerberghen *et al.*, 2005). Beispielsweise erhöhen sich die Konzentrationen von HBD-2 und HBD-3 unterschiedlich bei einem infektiösen oder entzündlichen Stimuli (Jia *et al.*, 2001; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Harder *et al.*, 2001). Allerdings konnte bei HBD-2 kein Zusammenhang zwischen Taschentiefe und Konzentration von HBD-2 festgestellt werden (Hosokawa *et al.*, 2006).

Die durchschnittliche Konzentration von HBD-2 im Speichel lag bei 0,150 µg/ml (Gorr, 2009). HBD-2 wird durch Entzündungsmediatoren stimuliert (Bals *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). HBD-1 wird konstitutiv exprimiert, wohingegen HBD-2 und HBD-3 eine Hochregulierung im entzündeten Gewebe aufweisen (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). Einige Autoren sind der Auffassung, dass es einen Zusammenhang zwischen der Schwere einer Parodontitis und Änderungen in der HBD-Konzentration durch die lokale Entzündung gibt (Kuula *et al.*, 2008; Vardar-Sengul *et al.*, 2007). So kommt es während einer aggressiven Parodontitis zu einer Hochregulierung von HBD-2 (Vardar-Sengul *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass der HBD-2 Spiegel im Speichel bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Gingivitis erhöht ist. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Konzentration an HBD-2 im Speichel und der Anzahl an Bakterien festgestellt werden (Pereira *et al.*, 2013). Die meisten Studien können erhöhte HBD-1 Werte in verschiedenen Epithelien feststellen, wohingegen HBD-2 signifikant in entzündetem Zahnfleisch erhöht ist (Darveau *et al.*, 1997; Page und Kornman, 1997).

Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien niedrigere Konzentrationen an HBD-1, HBD-2 und HBD-3 mRNA bei Parodontitis-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Kuula *et al.*, 2008; Bissell *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis weist

auch eine Studie von Hosokawa auf, in der eine erhöhte HBD-2 und HBD-3 mRNA-Expression auf dem entzündungsfreien gesunden Zahnfleisch beobachtet wird und eine geringere HBD-3 mRNA-Expression auf dem entzündeten Zahnfleisch (Hosokawa *et al.*, 2006). Ebenso konnten Zhao und Kollegen eine verminderte Expression von HBD-2 im entzündeten Gewebe feststellen (Zhao *et al.*, 1996).

In einer weiteren Studie wurden die HBD-1, HBD-2 und HBD-3 mRNA-Expressionsfrequenzen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis und gesunden Kontrollpersonen in der Sulkusflüssigkeit vor und nach der Behandlung mit Doxycyclin gemessen. Vor der Behandlung waren die Expressionsfrequenzen der drei antimikrobiellen Peptide 30%, 85% und 35%, bei den gesunden Kontrollpersonen konnten bis auf bei HBD-2 höhere Prozentangaben beobachtet werden (95%, 40% und 95%). Nach der Behandlung stiegen die Werte auf 85%, 45% und 85% und entsprechen somit den Werten der gesunden Kontrollpersonen (Mohamed, 2013). Es ist festzustellen, dass eine uneinheitliche Studienlage vorliegt.

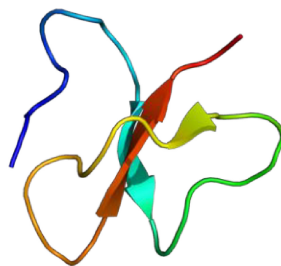


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von HBD-2 (Bauer *et al.*, 2001)

1.6 AMP-Wirkung auf Bakterien in der Mundhöhle

Aufgrund dessen, dass das Wissen über die Wirkung und Interaktion der AMPs auf parodontopathogene Bakterien im Biofilm recht gering ist, soll in dieser Studie die Wirkung der AMPs auf parodontopathogene Bakterien untersucht werden.

Laut einer Studie steigt während einer Parodontitis die Expression von LL-37 in der Sulkusflüssigkeit besonders in Anwesenheit von *P. gingivalis* an (Bachrach *et al.*, 2008). Zudem zeigt sich eine Resistenz von *P. gingivalis* gegenüber LL-37, welcher sich somit nur schwer abtöten lässt (Bachrach *et al.*, 2008; McCrudden *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2012; Puklo *et al.*, 2008). So wurde in der Studie von Bachrach und Kollegen *P. gingivalis* planktonisch kultiviert und AMPs, wie LL-37 dazugegeben und in der Folge eine Resistenzentwicklung beobachtet (Bachrach *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie wird von einer proteolytischen Inaktivierung von LL-37 durch

Bakterien des roten Komplexes, wie *P. gingivalis* und *T. forsythia* gesprochen. Dies kann mitunter der Grund für die Resistenzentwicklung von *T. forsythia* gegenüber LL-37 sein (Koziel *et al.*, 2010). Auch konnte festgestellt werden, dass die Konzentration von LL-37 in der Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit Parodontitis und der Anwesenheit von *P. gingivalis* im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant höher ist (McCrudden *et al.*, 2013). Die Aktivität von LL-37 richtet sich besonders gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Bucki *et al.*, 2010) dazu zählen, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, (Tanaka *et al.*, 2000) *P. intermedia* und *F. nucleatum* (Gorr und Abdolhosseini, 2011). Die Wirkung der AMPs gegenüber Bakterien hängt maßgeblich von der Dosis des AMPs ab. So kann mit einer Konzentration von 10 µg/ml (LD99) das Bakterium *A. actinomycetemcomitans* bei einer Kontaktzeit von einer Stunde abgetötet werden. In dieser Studie wurde *A. actinomycetemcomitans* in einer planktonischen Kultur kultiviert und mit LL-37 in Verbindung gebracht (Tanaka *et al.*, 2000).

Ebenso beeinflusst die Anwesenheit von den Bakterien *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *A. actinomycetemcomitans* die lokale Produktion der AMPs. Dabei korreliert die HNP1-3 Konzentration in der Sulkusflüssigkeit positiv mit der Menge an *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* aber nicht mit der Menge an *A. actinomycetemcomitans* (Puklo *et al.*, 2008). HNP-1 im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit wirkt besonders gegen *Strep. mutans*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*. Wohingegen eine Studie von Raj und Kollegen eine Unempfindlichkeit von HNP-1 bis HNP-3 gegenüber *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* belegt. Trotz Konzentrationen bis 500 µg/ml konnten keine nennenswerten Reaktionen von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* beobachtet werden (Raj *et al.*, 2000; Miyasaki *et al.*, 1990). In einer weiteren Studie konnte eine Synergie zwischen LL-37 und HNP-1 gegenüber *Staphylococcus aureus* beobachtet werden (Dale und Fredericks, 2005).

In verschiedenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen HBDs und parodontopathogenen Keimen festgestellt werden. *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* können beispielsweise die Expression von HBDs in vitro erhöhen (Taguchi und Imai, 2006; Feucht *et al.*, 2003). Andere Studien hingegen können diesen Zusammenhang nicht feststellen (Vankeerberghen *et al.*, 2005; Krisanaprakornkit *et al.*, 2000).

HBD-1 und HBD-2 sind aktiv gegen gramnegative Bakterien und Hefen, ihre Wirkung gegen grampositive Bakterien ist jedoch eingeschränkt (Quayle *et al.*, 1998). Andere Studien belegen eine gute Wirkung von β -Defensinen gegen grampositive und gramnegative Bakterien, wie *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* und *Strep. mutans* (Joly *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009). In einer Studie von Ji und Kollegen wurde die Empfindlichkeit von Bakterien des roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* gegenüber LL-37 getestet. Die Bakterien wurden planktonisch kultiviert und LL-37 dazugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Minimalen-Hemm-Konzentrationen (MIC) ($\mu\text{g/ml}$) von LL-37 gegenüber der Bakterien angegeben. (Für *P. intermedia* 15,7 $\mu\text{g/ml}$; für *A. actinomycetemcomitans* 37,8 $\mu\text{g/ml}$; für *P. gingivalis* >125 $\mu\text{g/ml}$; für *T. forsythia* <125 $\mu\text{g/ml}$; für *T. denticola* 39,4 $\mu\text{g/ml}$;) Die Bakterien zeigten eine stärkere Resistenz gegenüber LL-37 auf, als z.B. gegenüber *P. intermedia* (Ji *et al.*, 2007). Ebenso wurde in einer Studie von Joly und Kollegen aerobe und anaerobe Bakterien wie *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. micra* und *P. gingivalis* planktonisch kultiviert und HBD-2 dazupipetiert. Nach einer Inkubation von drei Stunden und 37°C reagierten 100% der aeroben Bakterien empfindlich auf HBD-2 und nur 21,4% der Anaerobier (Joly *et al.*, 2007). Insbesondere zeigt HBD-2 eine stärkere antimikrobielle Wirkung gegen gramnegative Bakterien, wie *E.coli* und *Pseudomonas aeruginosa* als gegen grampositive Bakterien, wie *Staph. aureus* (Harder *et al.*, 1997; Schröder und Harder, 1999; Scott *et al.*, 2000). Zudem weisen die Bakterien *T. denticola* und *P. gingivalis* eine Resistenz gegenüber β -Defensinen, wie HBD-2 auf (Devine *et al.*, 1999; Brissette und Lukehart, 2002; Shelburne *et al.*, 2005). Dabei wurden in diesen Studien *P. gingivalis* und *P. intermedia* in einem planktonischen Medium kultiviert und antimikrobielle Peptide dazupipetiert (Devine *et al.*, 1999; Shelburne *et al.*, 2005). Der MIC-Wert der vier Defensine HBD-1 bis HBD-4 für *P. gingivalis* variierte zwischen 3 und 12 $\mu\text{g/ml}$ (Shelburne *et al.*, 2004).

Aus den oben erwähnten Studien wird ersichtlich, dass keine einheitliche Datenlage bei der Wirkung von parodontopathogenen Bakterien auf AMPs vorliegt. Nach dem heutigen Wissensstand gibt es keine Untersuchung über die Wirkung von AMPs auf parodontopathogene Bakterien im Biofilm. Mit Hilfe von Biofilmen lassen sich die Verhältnisse in der Mundhöhle besonders gut nachahmen. Außerdem können unterschiedliche Organisationsformen und Konstellationen der Bakterien sowie das

Zusammenspiel der unterschiedlichen Spezies besser untersucht werden. Von daher ist es von großem Interesse in diesem Bereich weiter Forschung zu betreiben.

2 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Studie soll die Wirkung von verschiedenen AMPs (LL-37, HBD-2, HNP-1, HNP-3) in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml) auf parodontopathogene Keime getestet werden. Um möglichst realistische Verhältnisse ähnlich der Mundhöhle zu ermöglichen, kommt dazu ein Biofilmmodell zum Einsatz. Insbesondere soll eine eventuelle Interaktion der verschiedenen Bakterienspezies, welche zu unterschiedlichem Ansprechen von parodontopathogenen Keimen auf AMPs führt, untersucht werden. Dazu werden sowohl Monospezies-Bakterienkulturen als auch die unterschiedlichen Bakterienkombinationen, wie man sie klinisch am ehesten in den parodontalen Taschen vorfindet, untersucht.

Es wird somit die Hypothese aufgestellt, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Monospezieskulturen und den Multispezieskulturen im Hinblick auf ihre Sensibilität gegenüber AMPs gibt. Außerdem soll in dieser Studie die Überlegenheit von einzelnen AMPs gegen einzelne Bakterienspezies überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Mikroorganismen

In dieser Studie wurden Mikroorganismen des roten und orangen Komplexes und *A. actinomycetemcomitans* verwendet. Bei *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *F. nucleatum* handelt es sich um anaerobe gramnegative Stäbchen. *A. actinomycetemcomitans* ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes (mikroaerophiles) Stäbchen. *P. micra* ist ein grampositiver anaerober Kokkus und *T. denticola* ein gramnegativer anaerober Spirochät. Alle Bakterien wurden von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen bis auf *T. forsythia*. Dieser wurde bei der Firma LGC PromoChem bestellt (LGC PromoChem, Wesel, Deutschland). Eine Übersicht über die verwendeten Bakterien ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Bakterium	ATCC-Nummer	DSM-Nummer
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	11123	43718
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	20709
<i>Tannerella forsythia</i>	43037	18712
<i>Treponema denticola</i>	35405	14222
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	20706
<i>Parvimonas micra</i>	33270	20468
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586	20482

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Bakterien

3.2 Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien

Für die erfolgreiche Kultivierung anaerober Bakterien mussten besondere Kulturbedingungen eingehalten werden. So musste die Zusammensetzung der Medien auf das Bedürfnis des jeweiligen Mikroorganismus angepasst werden sowie war die Bebrütungstemperatur und die richtige Gasphase für das Wachstum von entscheidender Bedeutung. Die benötigten Substanzen für die Kultivierung wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und die Nährmedien von der Firma Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Im Folgenden werden die genauen Vorgehensweisen und Bedingungen für die Kultivierung erläutert.

3.2.1 Aufbau der anaeroben Werkbank

Um ein anaerobes Milieu in einer Sicherheitswerkbank (Shel Lab, Cornelius, OR, USA) aufbauen zu können, wurde diese mit einem Gasgemisch mit 5% H₂, 10% CO₂ und 85% N₂ geflutet (Linde, München, Deutschland). Die Hauptkammer konnte über zwei Zugänge erreicht werden. Der erste Zugang stellte die Schleuse dar, über welche Materialien in die Kammer gebracht werden konnten, der zweite Zugang waren die zwei Armports. Bevor Materialien über die Schleuse oder die Hände über die Armports das Arbeitsfeld in der Werkbank erreichten, wurde drei Mal Vakuum aufgebaut und mit Gas geflutet um möglichst wenig Sauerstoff in die anaerobe Atmosphäre zu bringen. Zusätzlich enthielt die Werkbank einen Inkubator. Mittels eines Katalysators wurde der restliche, in der Werkbank verbliebene Sauerstoff entfernt. Dieser musste täglich ausgetauscht werden und konnte durch Aufheizen bei 180°C für 120 Minuten reaktiviert werden. Außerdem wurde ein GasPak (BD Diagnostic, Heidelberg, Deutschland), welches die gleiche Wirkung wie der Katalysator hatte, täglich ausgetauscht sowie ein Indikatorstreifen (BD Diagnostic). Dieser diente durch einen Farbumschlag von hellblau auf weiß als Kontrolle für ein anaerobes Milieu, nachdem er mit destilliertem Wasser befeuchtet wurde. In Abbildung 4 wird die anaerobe Werkbank gezeigt.

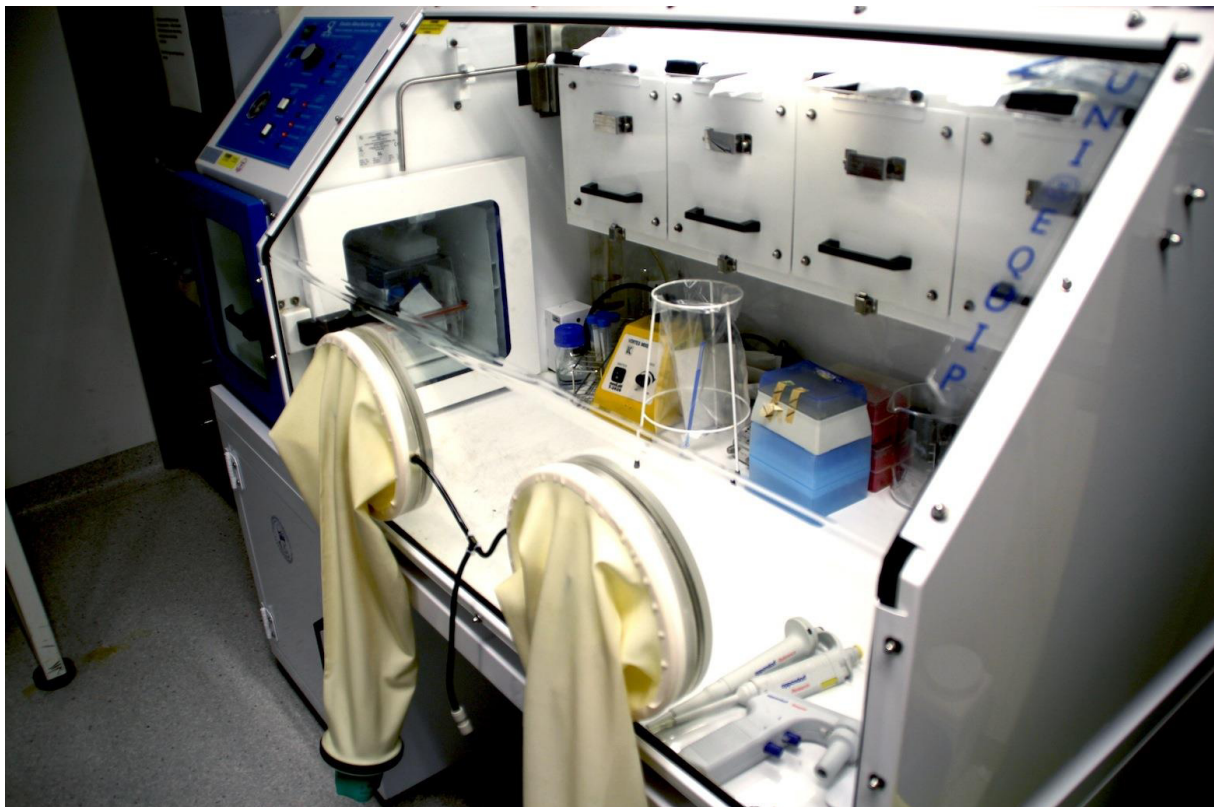


Abbildung 4: Anaerobe Werkbank

3.2.2 Herstellung der Medien

Da die Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen schwierig ist und komplexe Nährmedien unter anaerober Atmosphäre benötigt werden wurde zunächst in Vorversuchen das jeweilige beste Medium für jeden einzelnen Keim ermittelt. Zur Kultivierung der gramnegativen anaeroben Bakterien wurde für jedes einzelne Bakterium ein festes und ein flüssiges Nährmedium hergestellt, welches dem DSMZ Mikroorganismen-Katalog entnommen wurde. In Abbildung 5 ist ein BHI-Medium zu sehen. Die dort aufgeführten Medien sind für die Kultivierung anaerober Stämme getestet worden. Anders zusammengesetzte Medien, denen ein essentieller Bestandteil fehlte, könnten eine Wachstumsverzögerung zur Folge haben bzw. das Wachstum vollständig verhindern. Zusätzlich wurden die Bakterien auch auf fertiggekauften Medien (Schädler- und Brucella-Platten) kultiviert. Es konnte festgestellt werden, dass sich für die anaeroben Bakterien Brucella-Platten und für *A. actinomycetemcomitans* Schädler-Platten am besten eignen. Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung über die Herstellung der Medien:

Die einzelnen Substanzen wurden zunächst eingewogen, in Wasser gelöst und zum kochen gebracht. Nach dem Autoklavieren mit einem Dampfsterilisator (H+P, München, Deutschland) bei 121°C für 15 Minuten und dem Abkühlen wurden die hitzeempfindlichen Substanzen (z.B. Blut und Vitamine) hinzugefügt. Feste Nährmedien wurden in Platten (BD, Heidelberg, Deutschland) gegossen und nach dem Abkühlen bei 4°C gelagert. Flüssigmedien wurden in Flaschen aufbewahrt und ebenfalls bei 4°C gelagert. Die genaue Zusammensetzung der Medien kann aus dem Anhang entnommen werden. In Tabelle 2 ist ein Überblick über die Nährmedien und ihre besonderen Bestandteile.

Bakterium	Festkultur	Flüssigkultur
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Schädler-Agar	BHI
<i>P. gingivalis</i>	Brucella-Agar	BHI
<i>T. forsythia</i>	Brucella-Agar	PYH mit Hemin: 5 µg/ml; Menadione: 1 µg/ml; Pferdeserum: 5% v/v; N-Acetyl-Muraminsäure: 15 µg/ml
		NAM-Medium mit Hemin: 5 µg/ml; N-Acetyl-Muraminsäure: 15 µg/ml

<i>T. denticola</i>	Brucella-Agar	BHI
	TDM-Agar	TDM mit Thiamin + kurzkettige, gesättigte Fettsäuren: 6ng/ml; Kaninchenserum: 2% v/v
<i>P. intermedia</i>	Brucella-Agar	BHI
		TSB mit Schafsblut: 5% v/v
<i>P. micra</i>	Brucella-Agar	BHI
		PYG mit Hemin: 5 µg/ml; Menadione: 1 µg/ml
<i>F. nucleatum</i>	Brucella-Agar	BHI

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien



Abbildung 5: BHI-Medium

3.2.3 Anzucht der Bakterien und Kulturbedingungen

Die gefriergetrockneten Bakterienkulturen wurden in einer unter Vakuum verschlossenen Doppelampulle aus Glas geliefert. Um das gefriergetrocknete

Bakterium zu kultivieren musste zunächst das Glas gebrochen werden. Dazu wurde die Ampullenspitze über der Flamme erhitzt und drei Tropfen Wasser auf die erhitzte Spitze gegeben um das Glas zerspringen zu lassen. Mit einer Pinzette konnte nun der gesprungene obere Teil der Ampulle abgeklopft werden. Daraufhin konnte das innere Röhrchen, in dem sich das Bakterienpellet befindet, rehydriert werden. Da es sich um anaerobe Bakterien handelt erfolgten die nächsten Schritte der Kultivierung unter kompletten Sauerstoffausschluss und daher in der anaeroben Werkbank. Bei unseren ausgewählten gefriergetrockneten Bakterien wurde 0,5 ml des entsprechenden Mediums auf das Pellet pippetiert, mit einem Stopfen verschlossen und für 30 Minuten das Pellet rehydriert. Nach der Wartezeit wurde der Inhalt des Röhrchens mit einer Impföse umgerührt (VWR, Radnor, PA, USA). Ein Teil des Inhalts wurde auf entsprechend feste Nährmedien in Form des 3-Felder-Ausstrichs, indem die Impföse einmal in das Bakterienmedium eingetaucht wurde, ausgestrichen. Zusätzlich wurde jeweils 100 µl des aufgelösten Pellet pro Platte verwendet und mit dem Spatel ausplattiert (VWR). Der andere Teil des Inhalts wurde zum Animpfen der Flüssigmedien verwendet. Dabei wurden jeweils 50 µl der Bakteriensuspension zu dem Flüssigmedium gegeben, welche jeweils in Falcon-Röhrchen (5 ml) abgefüllt wurden (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich). Sowohl die Platten als auch das Flüssigmedium mit den Bakterien wurden für die nächsten zwei bis drei Tage in einem Brutschrank bebrütet. *A. actinomycetemcomitans* wurde außerhalb der anaeroben Werkbank kultiviert und bei 60% Luftfeuchtigkeit, 5,8% CO₂ und 37°C bebrütet (Thermo, Schwerte, Deutschland). Die anaerobe Bebrütung erfolgte in einem integrierten Brutschrank der anaeroben Werkbank bei 37°C unter Flutung durch das Gasgemisch. Außerdem wurden die anaeroben Bakterien zusätzlich auch in einem Gas Pak (BD) außerhalb der anaeroben Werkbank bebrütet, um den Gasgemischschwankungen der anaeroben Werkbank zu entgehen. Nach 48 Stunden konnte bei den meisten Platten und Flüssigmedien ein Wachstum erkannt werden und die ersten Bakterien konnten überimpft werden. Dabei wurde eine Bakterienkolonie mit einer Impföse aufgenommen und auf einer neuen Platte des entsprechenden Mediums im 3-Felder-Ausstrich ausgestrichen. In Abbildung 6-17 ist von jedem Bakterium eine Platte in Groß- und Detailaufnahme zu sehen. Abbildung 18 zeigt *T. denticola* in einem Flüssigmedium.



Abbildung 6 und 7: Bebrütete Platte von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

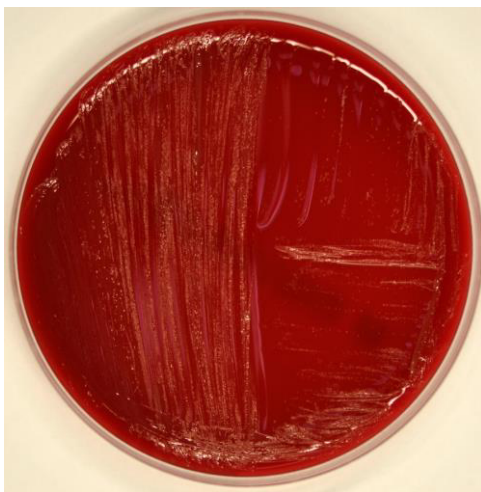


Abbildung 8 und 9: Bebrütete Platte von *Porphyromonas gingivalis*

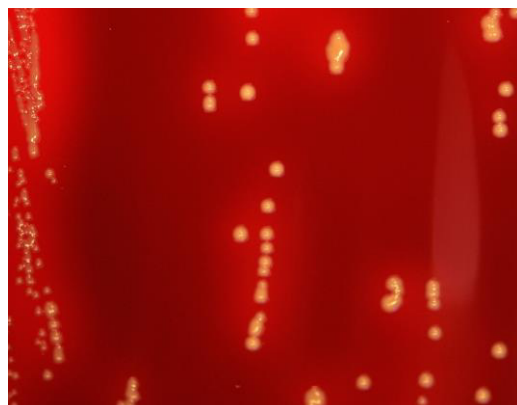


Abbildung 10 und 11: Bebrütete Platte von *Tannerella forsythia*



Abbildung 12 und 13: Bebrütete Platte von *Prevotella intermedia*

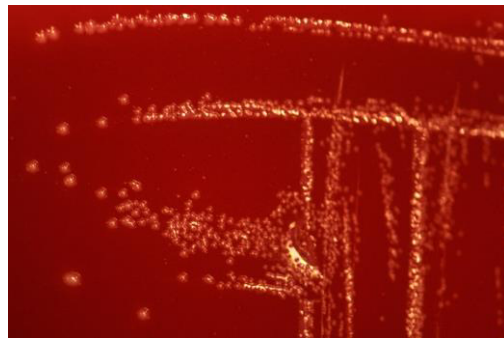
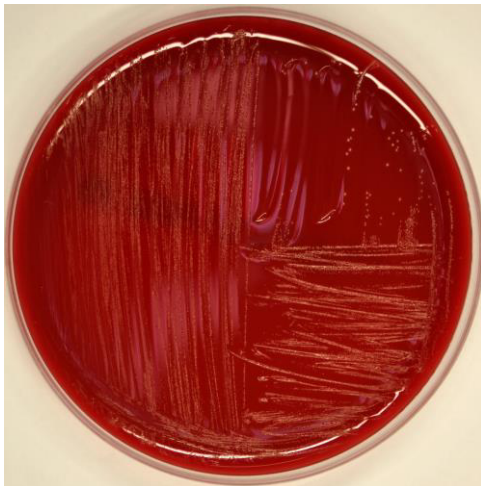


Abbildung 14 und 15: Bebrütete Platte von *Parvimonas micra*

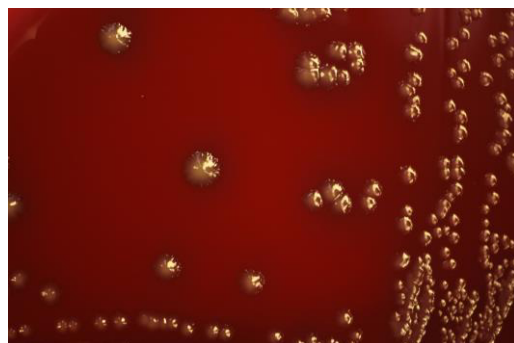


Abbildung 16 und 17: Bebrütete Platte von *Fusobacterium nucleatum*

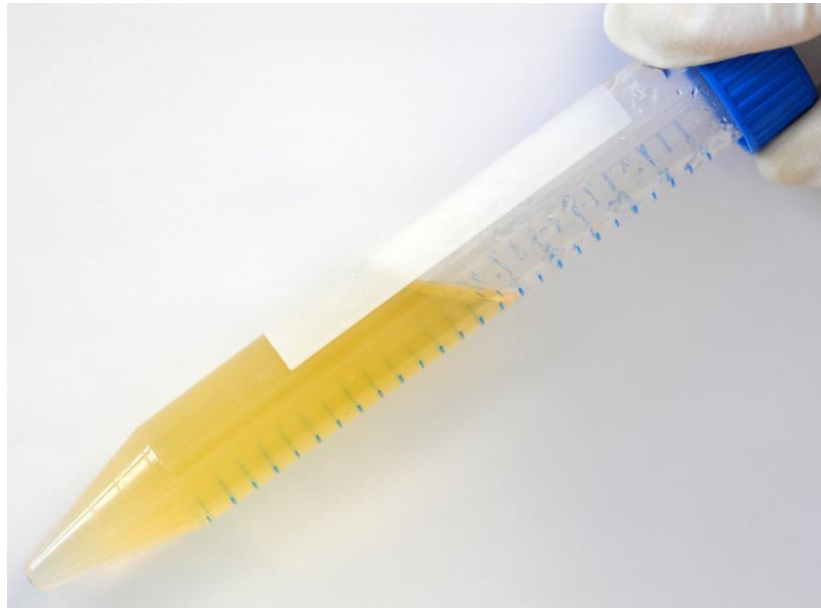


Abbildung 18: *Treponema denticola*-Röhrchen

3.3 Stammerhaltung

Um eine Stammkultur des Bakteriums zum Einfrieren zu erhalten wurde ein Medium hergestellt, welches aus dem jeweiligen Medium des Bakteriums besteht und 10% Glycerin enthielt. Mit einer Impföse wurden Bakterienkolonien von den Agerplatten aufgenommen und in das neue Medium übertragen und resuspendiert. Diese wurden bei -196°C in der Gasphase eines Stickstofftanks eingefroren (Therma, Schwerte, Deutschland).

3.4 Biofilmmedium und Biofilmanzucht

Das Medium zur Biofilmanzucht (BMM; Wong und Sissons, 2001) bestand aus den Muzinen des Schweinemagens, Peptone Nr. 3, Trypticase, Hefeextrakt und Kaliumchlorid. Nach dem Kochen und Autoklavieren wurden die hitzeempfindlichen Substanzen, wie Hemin- Menadione- Harnstoff- und Arginin-Lösung hinzugefügt. Im Anhang findet sich eine Beschreibung der genauen Zusammensetzung. Für die erfolgreiche Biofilmanzucht wurden zunächst Rinderzähne mit einer Diamantsäge in die passenden Größen zugeschnitten. Die entstandenen Dentinplättchen wurden mit EDTA gespült und in Ringerlösung mit Natriumazid (NaN_3) eingelegt und gewaschen. Vor jeder Anzucht wurden die Plättchen im Autoklaven sterilisiert. Des Weiteren wurde eine Haltevorrichtung aus Metall hergestellt um die Dentinplättchen für die Biofilmanzucht zu platzieren (siehe Abbildung 19 und 20). Es wurde eine 6-well-Platte (Greiner Bio-One) verwendet, in welche pro Well ein Träger platziert wurde, indem circa 17 Dentinplättchen positioniert werden konnten. Die

Biofilmanzucht der anaeroben Bakterien erfolgte in der anaeroben Werkbank. Jedes Well mit Träger wurde mit 9 ml des BMM-Mediums befüllt um eine vollständige Deckung der Dentinplättchen mit Medium zu gewährleisten.

Anschließend wurde das jeweilige Bakterium zur Biofilmanzucht von verschiedenen Platten oder Flüssigmedien mit einer Impföse entnommen und in 1 ml Kochsalzlösung mit so vielen Bakterien gelöst, dass eine McFarlandstanddichte von 6 erreicht wurde. Daraufhin wurde die Bakterienflüssigkeit gevortext und die Bakteriensuspension mit der Pipettenspitze resuspendiert. Jedes Well wurde mit 100 µl der Bakteriensuspension angeimpft. Abbildung 19 zeigt den Versuchsaufbau mit 6-Well-Platte und Metallständer. Um eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension sicherzustellen wurde die 6-Well-Platte auf einen Forma Orbital Shaker (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) bei 37°C für acht Stunden gestellt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium mit der Pipette abpipettiert und circa 5 ml frisches BMM-Medium mit der Pipette dazupipettiert. Außerdem wurde das Medium mit Bakterien nach den oben beschriebenen Schritten beimpft, damit ein reifer Biofilm entstehen konnte.

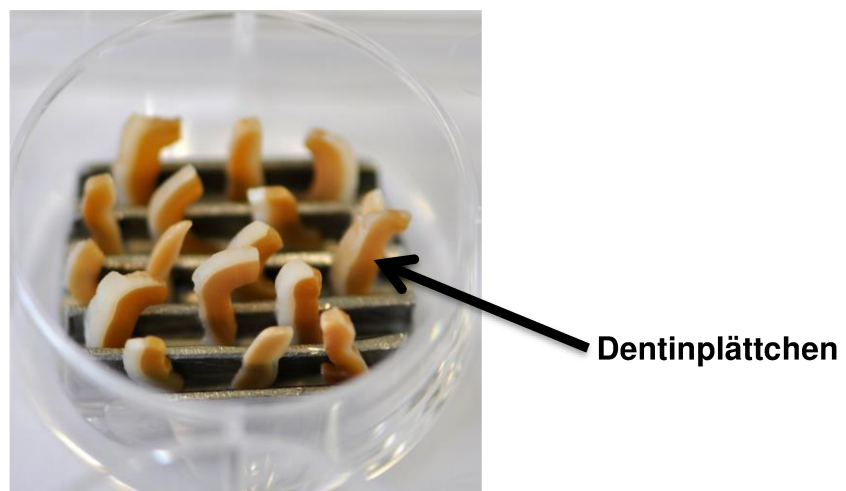


Abbildung 19: Metallständer in 6-Well-Platte mit Dentinplättchen

3.5 Sensibilitätstestung der Bakterien gegenüber AMPs

In der Studie wurden die AMPs LL-37, HBD-2, HNP-1 und HNP-3 verwendet. Die Aminosäuresequenzen sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. Die AMPs wurden in lyophilisierter Form in einer Menge von 110 µg pro Flasche von der Firma (Peptide Institute, Osaka, Japan) geliefert. Zur Herstellung einer Stammlösung für die Durchführung der Wirksamkeit der Substanzen gegenüber der Bakterien wurde die

gefriergetrocknete Form mit 1100 µl PBS in Lösung gebracht. Dadurch wurde eine Konzentration von 100 µg/ml hergestellt, die jeweils um den Faktor 10, 20 oder 100 mit PBS verdünnt wurde, um die gewünschten AMP-Konzentrationen 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml zu erhalten. Diese Verdünnungen wurde für alle vier ausgewählten AMPs (LL-37, HBD-2, HNP-1, HNP-3) hergestellt, zusätzlich wurden Lösungen angesetzt, die alle vier AMPs in Kombination enthielten. Diese Lösungen waren maximal vier Wochen haltbar und mussten bei -20°C gelagert werden. Als Negativkontrolle wurde 0,9%-ige Kochsalzlösung verwendet.

AMP	Aminosäuresequenz
LL-37	Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser
HBD-2	Gly-Ile-Gly-Asp-Pro-Val-Thr-Cys-Leu-Lys-Ser-Gly-Ala-Ile-Cys-His-Pro-Val-Phe-Cys-Pro-Arg-Arg-Tyr-Lys-Gln-Ile-Gly-Thr-Cys-Gly-Leu-Pro-Gly-Thr-Lys-Cys-Cys-Lys-Lys-Pro
HNP-1	Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys
HNP-3	Asp-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys

Tabelle 3: Übersicht über Aminosäuresequenzen

Zunächst wurden die mit Biofilm bewachsenen Dentinplättchen in den einzelnen Wells einer 96-well Platte platziert. Anschließend wurden 250 µl der verschiedenen AMP-Lösungen zu den Dentinplättchen dazupipettiert und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. In Abbildung 20 ist die 96-Well-Platte mit den Dentinplättchen zu sehen. Nach der Inkubationsphase wurde der Biofilm gelöst und für 45 Minuten inkubiert. Durch das anschließende Vortexen der Eppendorf-Gefäße für 10 Sekunden wurde die Ruptur und das Lösen der Biofilme von den Plättchen sichergestellt. Daraufhin wurde zwei Mal pro Eppendorf-Gefäß 100 µl der gelösten Biofilmlösung in eine 96-well-Platte pipettiert. Durch das Dazupipettieren von 10 µl eines alamarBlue® Reagens (Invitrogen) und einer anschließenden Inkubationszeit von mehreren Stunden konnte die Überlebensrate der Bakterien mit Hilfe eines biochemischen Nachweisverfahrens fluorometrisch bestimmt werden. Die Messungen fanden nach 60 Minuten und 120 Minuten im Fluorometer statt (Varioscan Thermo). Alle Experimente wurden drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

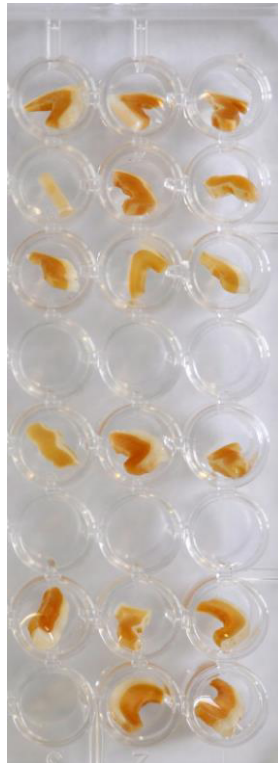


Abbildung 20: Dentinplättchen in 96-Well-Platten

3.5.1 alamarBlue®-Assay

Das alamarBlue®-Assay dient als Nachweisverfahren der Überlebensrate von Zellen durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs. Dabei wird die metabolische Aktivität in lebenden Zellen über die Zellatmung gemessen. Der aktive Bestandteil des alamarBlue® ist das Resazurin, ein nicht toxischer und zellpermeabler Stoff. Dieser wird zu Resorufin reduziert, was sich durch eine Farbveränderung von blauem Resazurin zu rotem Resorufin zeigt. Außerdem kann eine Änderung der Fluoreszenz gemessen werden (Nakayama *et al.*, 1997, Nociari *et al.*, 1998). Abbildung 21 zeigt den Reduktionsschritt von Resazurin zu Resorufin und Abbildung 22 eine alamarBlue®-Platte nach abgeschlossener Reaktion. Die Anregungswellenlänge mit Licht liegt pro Well bei 570 nm und die zurückkommende Intensität an Licht liegt bei 585 nm. Je höher die Intensität des emitierten Lichts desto höher ist die Überlebensrate der Bakterien und desto mehr Resorufin ist entstanden. Je nach Zellkultur werden unterschiedliche Inkubationsbedingungen vorgesehen. Routineanalysen empfehlen 10 µl pro Vertiefung für zwei Stunden bei 37 °C (Page *et al.*, 1993, Gloeckner *et al.*, 2001).

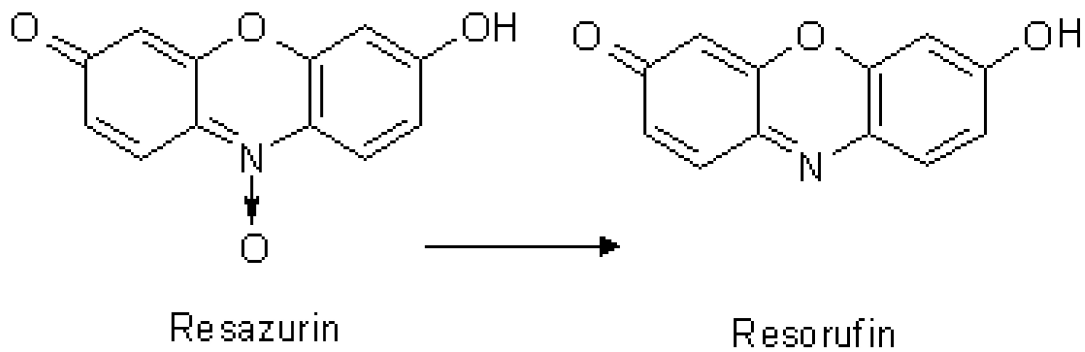


Abbildung 21: Reduktionsschritt Resazurin in Resorufin (Brouwer et al., 2005)

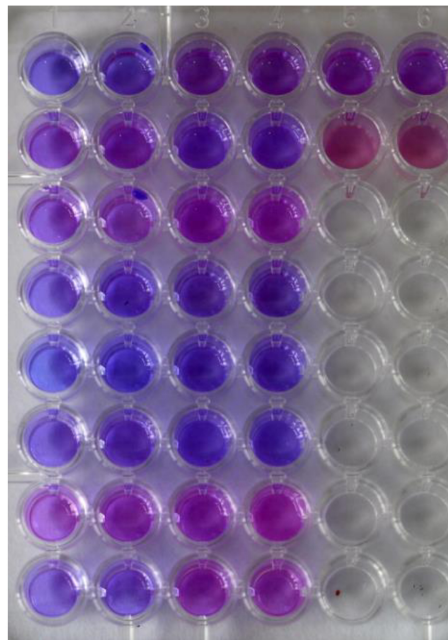


Abbildung 22: alamarBlue®-Platte nach abgeschlossener Reaktion

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Bakterienreduktion erfolgte zunächst deskriptiv. Dazu wurden die Überlebensraten der Bakterien in Prozent der Negativkontrolle anhand der Fluoreszenzwerte errechnet.

Im Anschluss daran wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (Oneway-ANOVA, α -Level 0,05) mit Least-Significance-Post-Hoc-Test (LSD-Test) durchgeführt, um verschiedene Einflussfaktoren, wie die AMP-Konzentration und die verwendete Bakterienspezies auf die Überlebensrate zu untersuchen. Diese Tests kamen zunächst innerhalb der Bakteriengruppen zur Anwendung, um im Anschluss einen Vergleich aller untersuchten Kombinationen durchzuführen. Die statistische Auswertung wurde unter zu Hilfenahme einer Statistik-Software durchgeführt (SPSS, Version 21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Auswertung

Im Folgenden wird die Überlebensrate der Bakterien abhängig von Keim, Konzentration und AMP deskriptiv dargestellt.

Generell kann man feststellen, dass je höher bei *A. actinomycetemcomitans* die AMP-Konzentration war, eine geringere Überlebensrate festzustellen war (ANOVA $p = 0,002$, $\eta^2 = 0,340$). Die Post-Hoc-Analyse mittels LSD-Test zeigte, dass sowohl die Konzentration der AMPs von 10 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber 1 $\mu\text{g/ml}$ als auch 5 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber 1 $\mu\text{g/ml}$ überlegen war ($p = 0,001$; $p = 0,011$). Die geringste Überlebensrate war bei HBD-2 (10 $\mu\text{g/ml}$) festzustellen mit einer Überlebensrate um circa 45% gefolgt von HNP-1 mit circa 50%. Dies wird in Abbildung 23 ersichtlich.

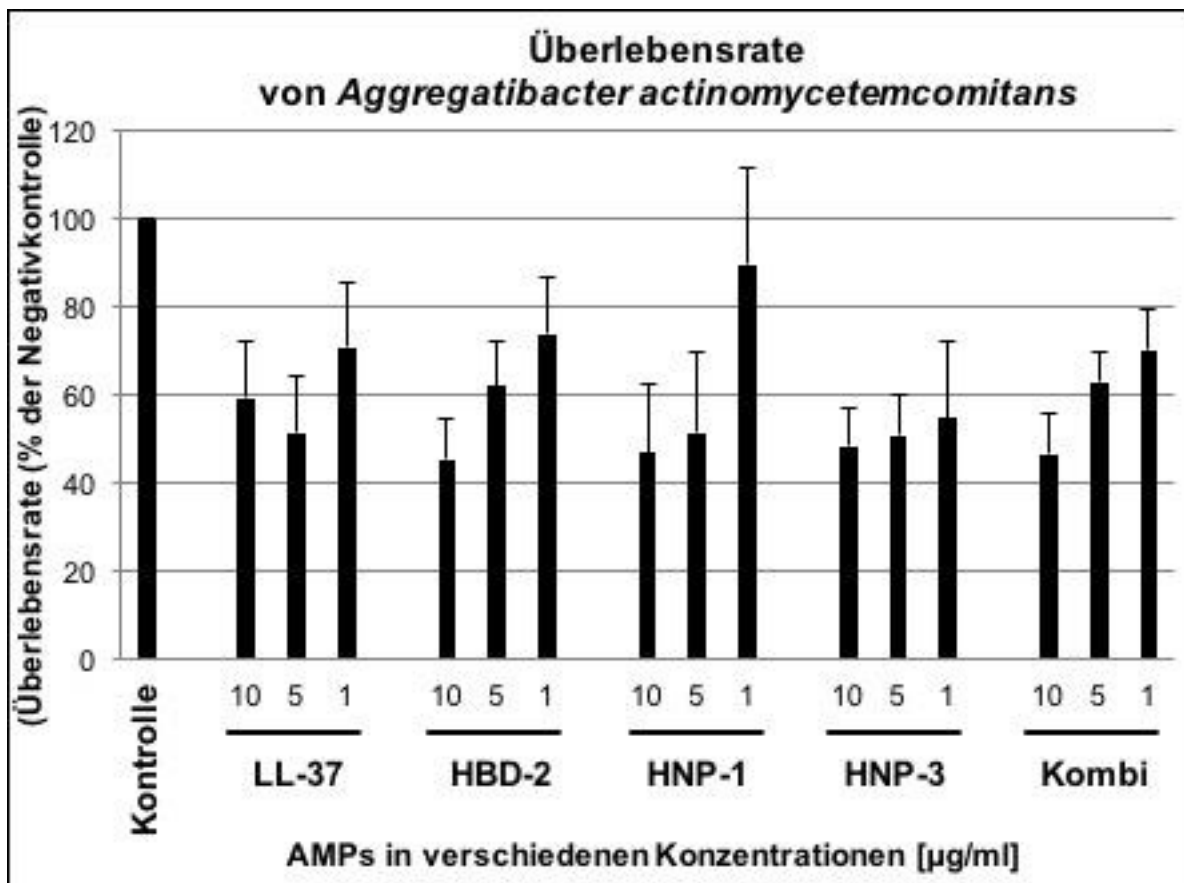


Abbildung 23: Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* abhängig von AMP und Konzentration

Bei der Überlebensrate der Bakterien des roten Komplexes übten die verschiedenen Konzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$) keinen signifikanten Einfluss aus. Die geringste Überlebensrate konnte bei dem roten Komplex bei der Kombination der 4

verschiedenen AMPs erreicht werden. Darauf schloss sich HBD-2 an, wobei nur 40% der Bakterien überlebten. HNP-1 und HNP-3 zeigten eine ähnlich geringe Überlebensrate von etwa 50%, was in Abbildung 24 gezeigt wird.

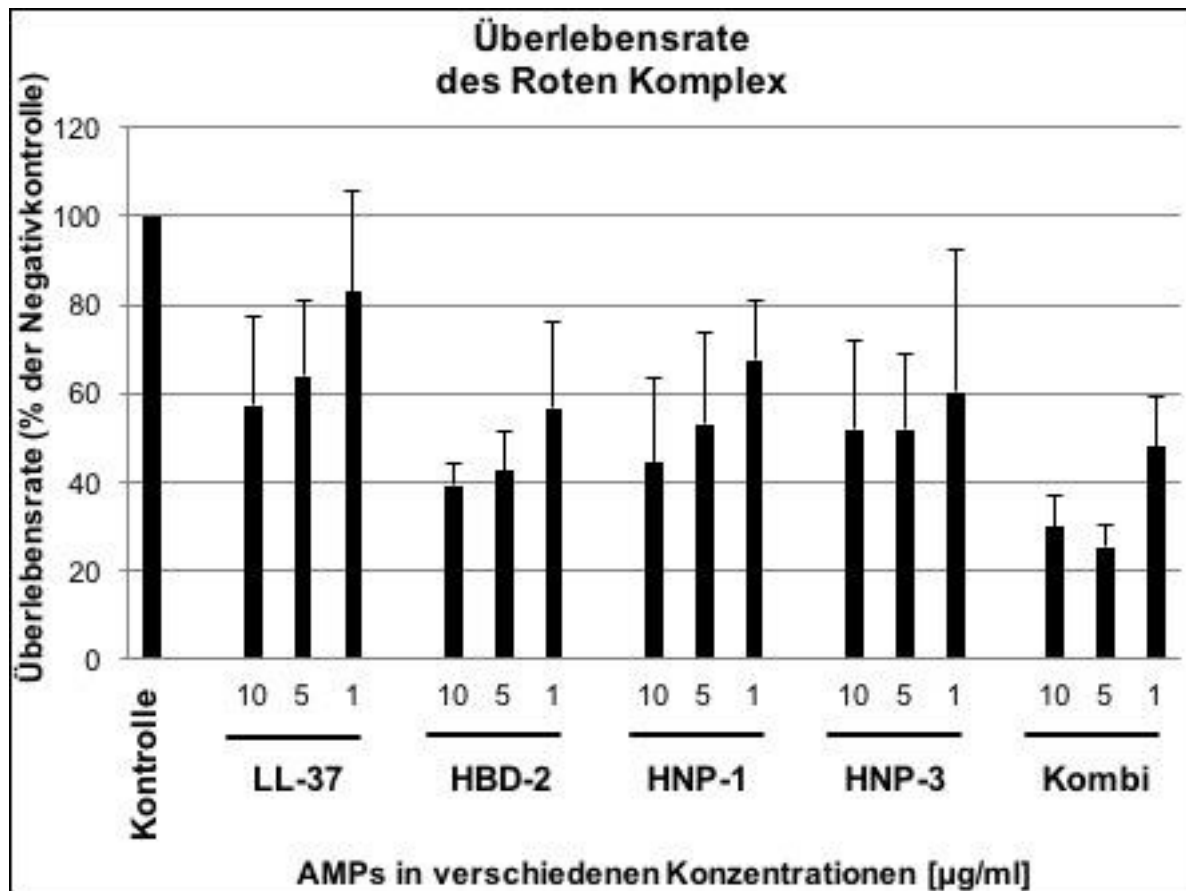


Abbildung 24: Überlebensrate des Roten Komplex abhängig von AMP und Konzentration

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *P. gingivalis* eine relativ gleichbleibende Überlebensrate bei den verschiedenen AMPs. Auch hier konnten keine signifikanten Einflüsse der Konzentration beobachtet werden. Die Überlebensrate durch die AMPs lag zwischen 50 und 70%. Die geringste Überlebensrate konnte bei der Kombination der 4 verschiedenen AMPs mit circa 50% beobachtet werden (siehe Abbildung 25).

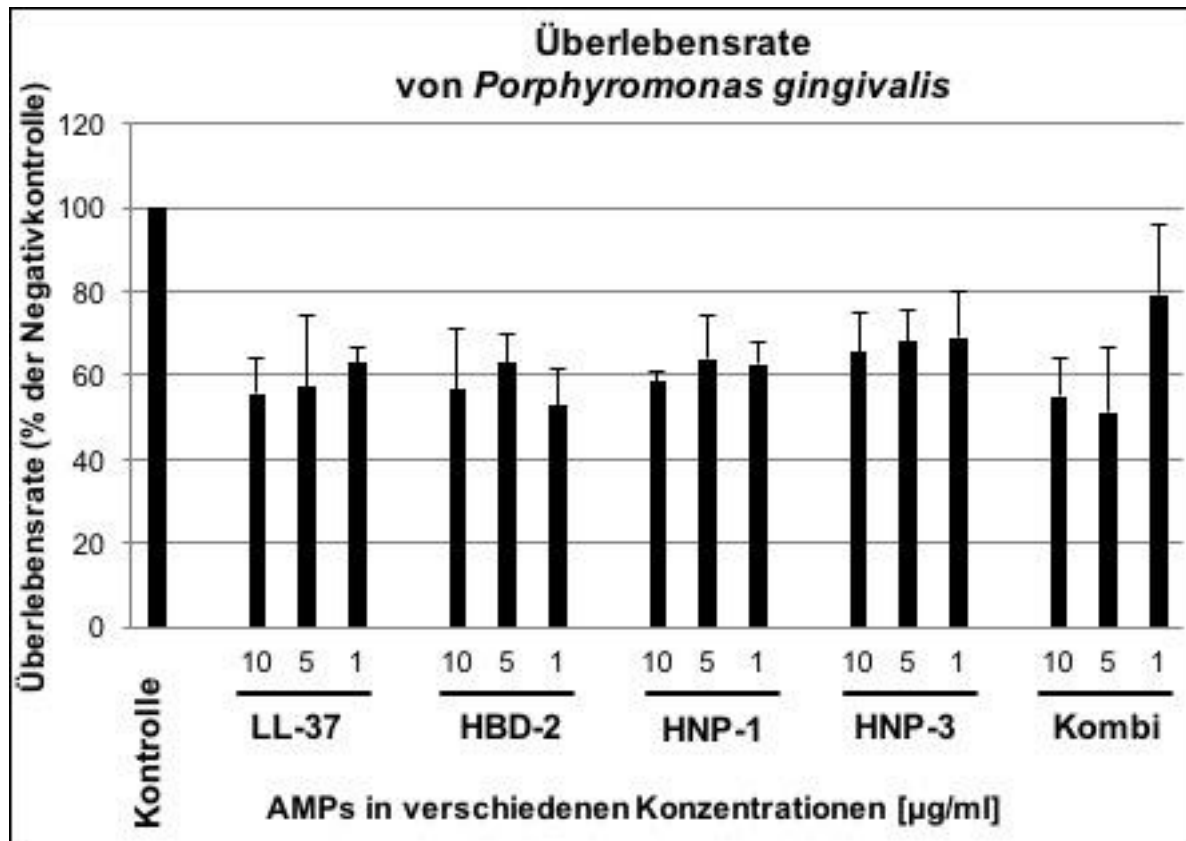


Abbildung 25: Überlebensrate von *P. gingivalis* abhängig von AMP und Konzentration

Bei dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* zeigten sich zwischen den AMPs nur geringe Wirkungsunterschiede. Außerdem übten die verschiedenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Bakterien aus. Die Überlebensrate bei den verschiedenen AMPs war bei circa 85%. Allerdings konnte bei der Kombination der 4 verschiedenen AMPs die geringste Überlebensrate von circa 75% beobachtet werden, was in Abbildung 26 ersichtlich wird.

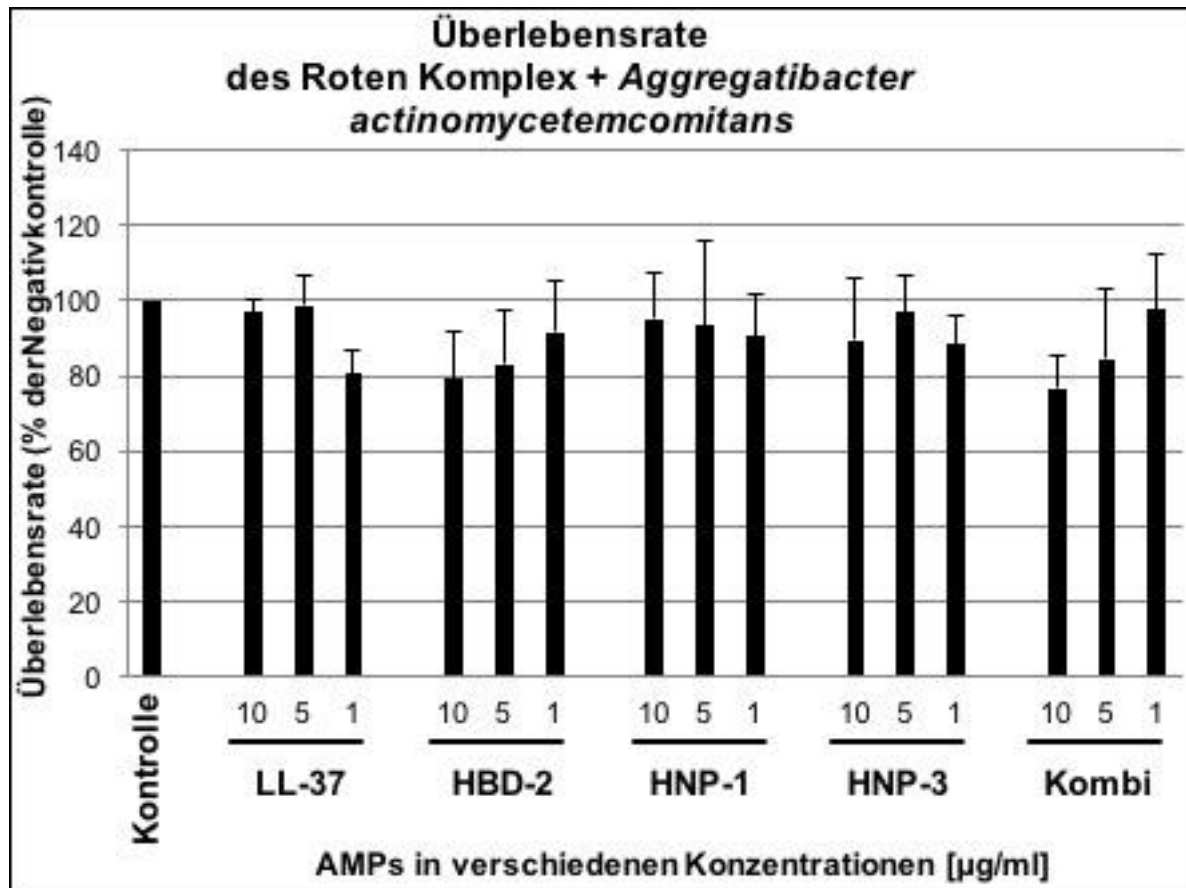


Abbildung 26: Überlebensrate des Roten Komplex in Kombination mit *A. actinomycetemcomitans* abhängig von AMP und Konzentration

Auch bei *F. nucleatum* konnte man mit zunehmender AMP-Konzentration eine geringere Überlebensrate beobachten (ANOVA $p = 0,003$; $\eta^2 = 0,314$). Die Post-Hoc-Analyse mittels LSD-Test zeigte, dass sowohl die Konzentration der AMPs von 10 µg/ml gegenüber 1 µg/ml als auch 5 µg/ml gegenüber 1 µg/ml überlegen war ($p = 0,001$; $p = 0,040$). Zudem ergab sich die geringste Überlebensrate bei HBD-2 (10 µg/ml) gefolgt von der Kombination der 4 verschiedenen AMPs (10 µg/ml). Dabei war die Überlebensrate circa 70%. Abbildung 27 verdeutlicht diese Beobachtungen.

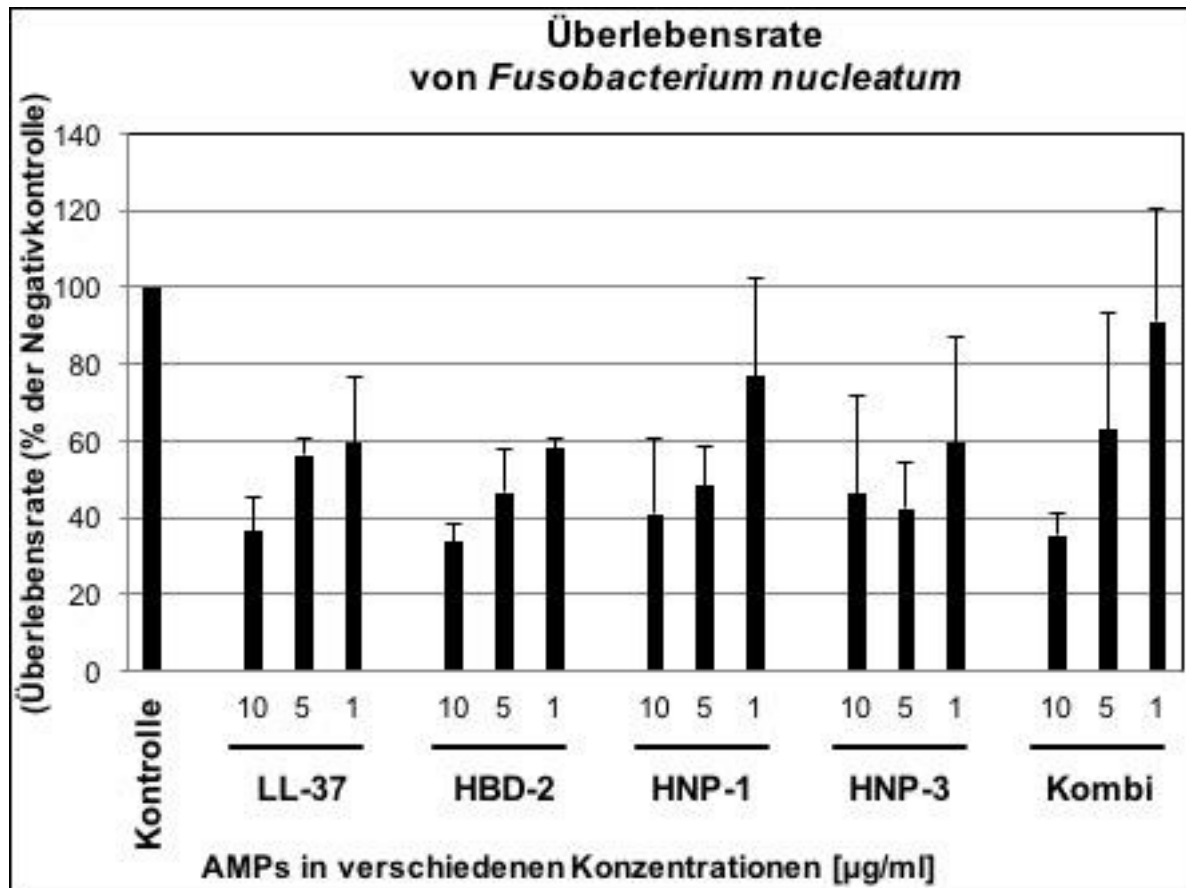


Abbildung 27: Überlebensrate von *F. nucleatum* abhängig von AMP und Konzentration

Ebenfalls sank bei *P. intermedia* mit zunehmender Konzentration die Überlebensrate (ANOVA $p < 0,0001$; $\eta^2 = 0,486$). Mit Hilfe des LSD-Tests konnte für die Konzentration von 10 µg/ml gegenüber 5 µg/ml und 1 µg/ml geringere Überlebensraten festgestellt werden ($p < 0,0001$; $p = 0,001$). Auf LL-37 mit der geringsten Überlebensrate von etwa 30% schloss sich HNP-1 (10 µg/ml) mit einer Überlebensrate von etwa 40% an (siehe Abbildung 28).

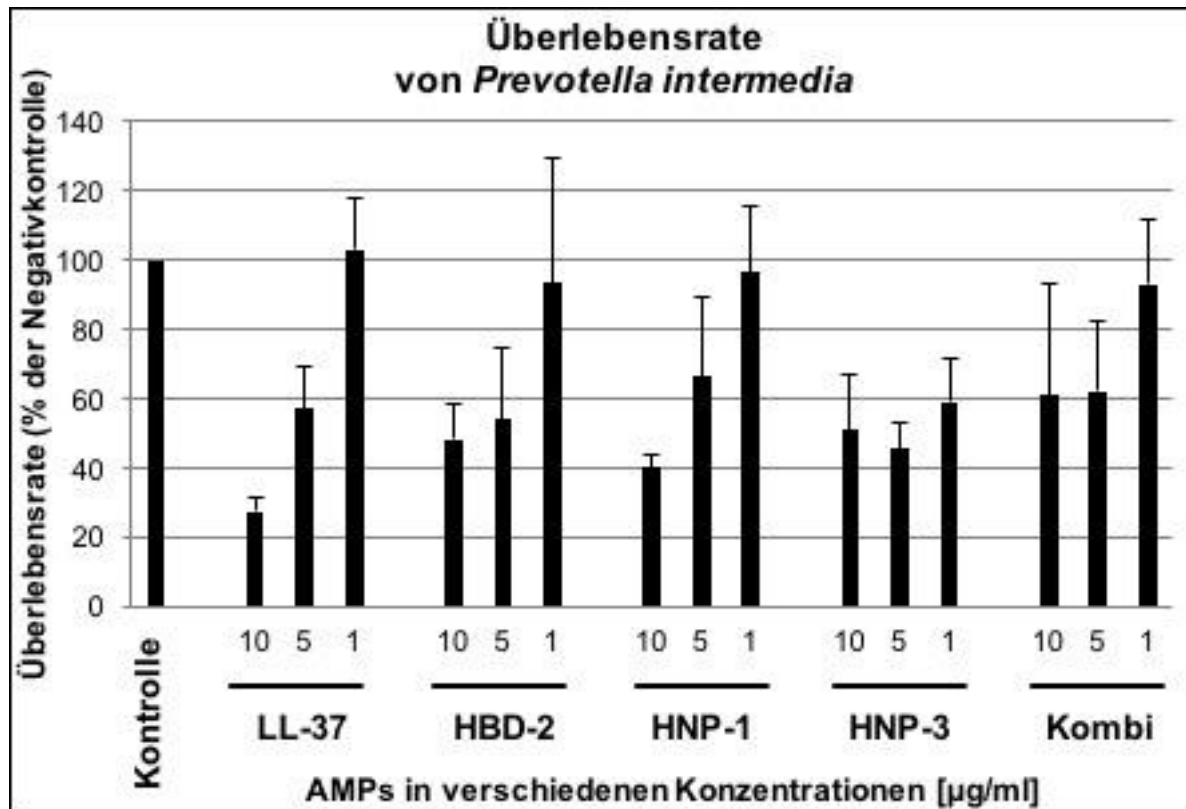


Abbildung 28: Überlebensrate des *P. intermedia* abhängig von AMP und Konzentration

Für *P. micra* ergab sich eine relativ konstante Überlebensrate von circa 60% für die verschiedenen AMPs. Ebenfalls zeigte sich bei *P. micra* keine signifikanten Ergebnisse bei Betrachtung der unterschiedlichen Konzentrationen. Die geringste Überlebensrate konnte bei HNP-1 mit 50% festgestellt werden. Darauf folgten HBD-2 und HNP-3. Dies wird in Abbildung 29 dargestellt.

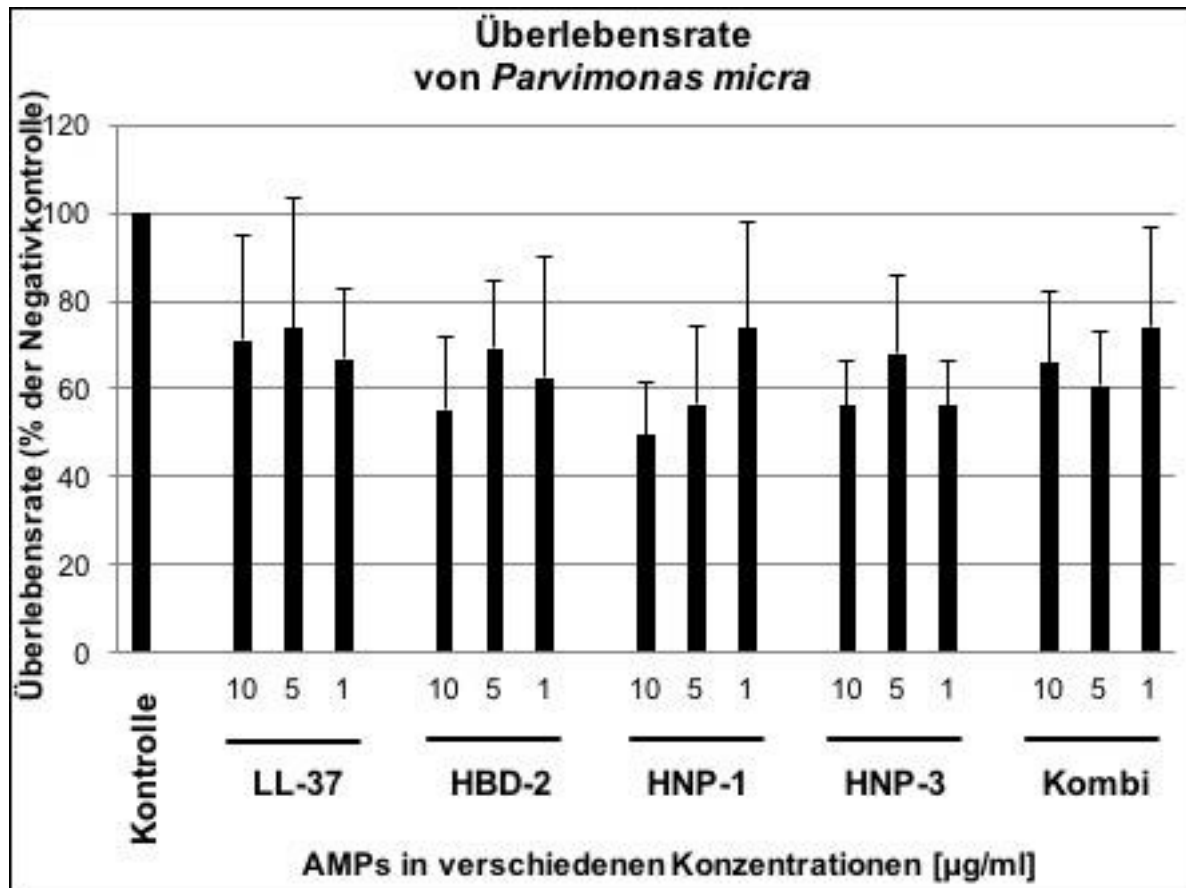


Abbildung 29: Überlebensrate von *P. micra* abhängig von AMP und Konzentration

Insgesamt konnte bei der Kombination aus dem roten Komplex und *P. micra* eine höhere Überlebensrate durch die AMPs verzeichnet werden im Vergleich zu den einzelnen Bakterienstämmen wie z.B. bei *A. actinomycetemcomitans*. Des Weiteren konnten keine signifikanten Einflüsse der Konzentration auf die Kombination aus roten Komplex und *P. micra* beobachtet werden. Allerdings konnte bei HBD-2 und HNP-1 eine geringere Überlebensrate von circa 70% festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnte bei den anderen AMPs eine Überlebensrate von circa 85% beobachtet werden (siehe Abbildung 30).

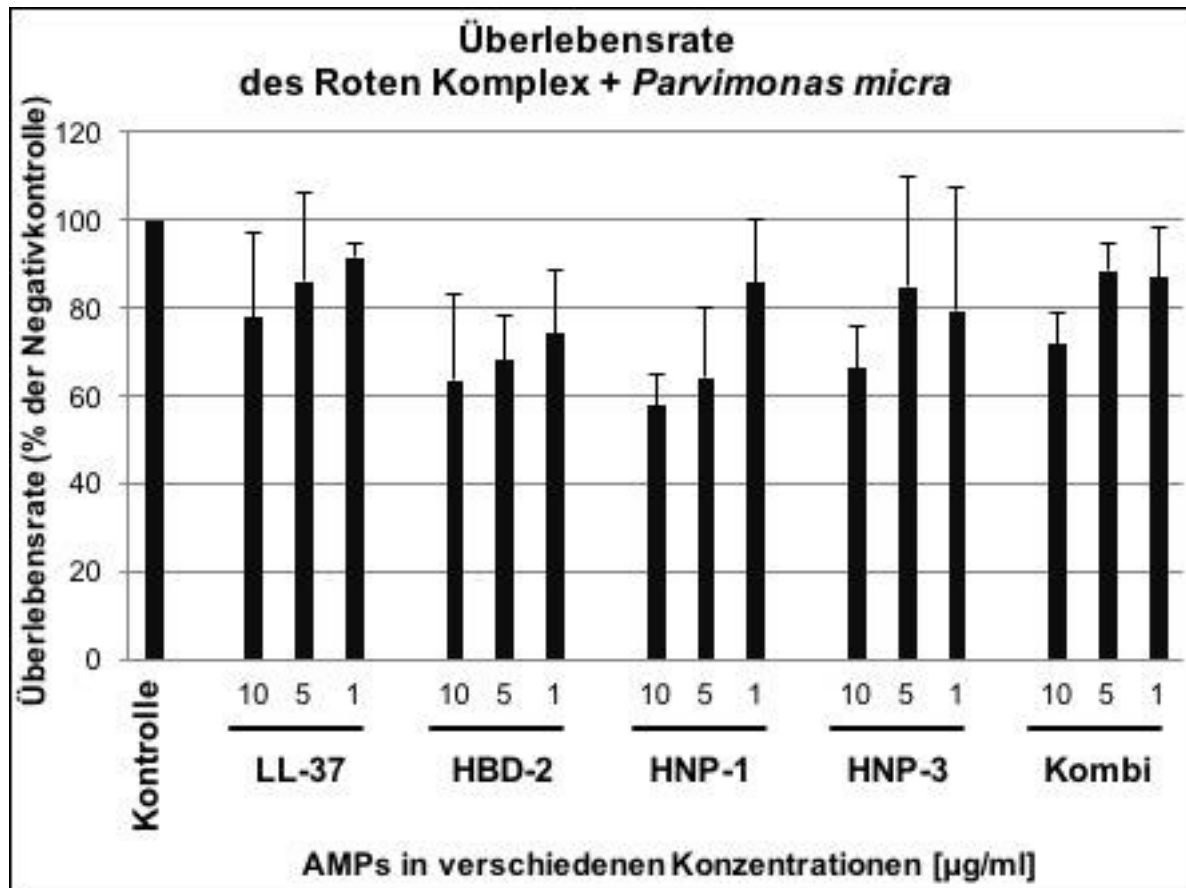


Abbildung 30: Überlebensrate des Roten Komplex und *P. micra* abhängig von AMP und Konzentration

Eine Übersicht über die Überlebensraten der Bakterien zeigt Tabelle 5.

Gruppe	AMPs				
	LL-37	HBD-2	HNP-1	HNP-3	combination
AA	51,6 – 70,7%	45,6 – 73,7%	46,8 – 89,7%	48,6 – 54,7%	46,7 – 70,2%
RC	57,2 – 82,9%	39,2 – 56,6%	44,2 – 67,4%	51,8 – 60,4%	29,9 – 47,8%
RC+AA	80,7 – 98,6%	79,2 – 91,6%	90,6 – 95,1%	88,3 – 96,8%	76,7 – 97,4%
FN	36,6 – 59,6%	33,7 – 58,1%	40,8 – 76,9%	46,1 – 59,4%	35,6 – 91,1%
PI	27,2 – 103,2%	48,0 – 93,5%	40,1 – 96,4%	50,8 – 59,0%	61,1 – 93,1%
RC+PM	77,7 – 91,5%	63,4 – 74,0%	57,7 – 85,6%	66,1 – 84,7%	71,6 – 88,4%

Tabelle 4: Bakterielle Überlebensraten der verschiedenen Bakteriengruppen nach Inkubation mit verschiedenen AMPs mit hohen und niedrigen Konzentrationen (10 µg/ml–1 µg/ml)

4.2 Statistische Datendarstellung

Die statistische Auswertung der Überlebensrate für die jeweils höchste AMP-Konzentration mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Oneway-ANOVA) mit Least-Significance-Post-Hoc-Test (LSD-Test) ergab folgende Ergebnisse.

Vergleicht man die Überlebensrate durch AMPs von *A. actinomycetemcomitans* mit denen der Kombination der Bakterien des roten Komplexes und *A. actinomycetemcomitans* ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede für alle getesteten AMPs. Dabei war die Überlebensrate für *A. actinomycetemcomitans* stets signifikant geringer als für die Kombination mit dem roten Komplex (Abbildung 31 a-d, für LL-37 $p = 0,02$; für HBD-2 $p = 0,037$; für HNP-1 $p = 0,003$; für HNP-3 $p = 0,011$).

Betrachtet man die Überlebensrate durch die Kombination der 4 getesteten AMPs (Konzentration je 10 µg/ml) zeigte sich stets eine geringere Überlebensrate bei *A. actinomycetemcomitans* alleine im Vergleich zu den einzelnen AMPs bei der Kombination aus *A. actinomycetemcomitans* und dem roten Komplex (Abbildung 31 e-h, für LL-37 $p = 0,002$; für HBD-2 $p = 0,044$; für HNP-1 $p = 0,003$; für HNP-3 $p = 0,008$). Jedoch wurde die Keimzahl innerhalb der einzelnen Bakteriengruppen durch die Kombination aller 4 AMPs nicht signifikant mehr reduziert.

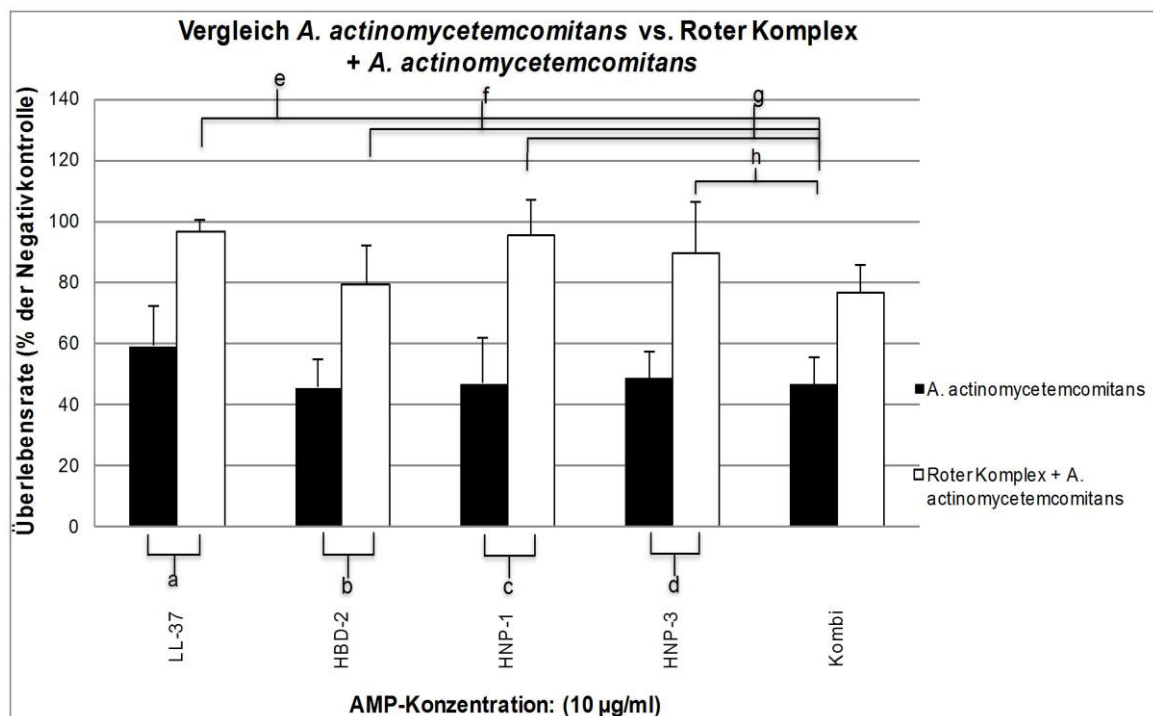


Abbildung 31: Vergleich der Überlebensrate zwischen *A. actinomycetemcomitans* und dem Roten Komplex + *A. actinomycetemcomitans* (a $p = 0,02$; b $p = 0,037$; c $p = 0,003$; d $p = 0,011$; e $p = 0,002$; f $p = 0,044$; g $p = 0,003$; h $p = 0,008$)

Bei der Gegenüberstellung der Überlebensrate zwischen dem roten Komplex und der Kombination der Bakterien des roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* konnten für alle getesteten AMPs signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine signifikant geringere Überlebensrate der Bakterien ergab sich für den roten Komplex alleine als für die Kombination mit dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans*. (Abbildung 32a-e, für LL-37 $p = 0,014$; für HBD-2 $p = 0,013$; für HNP-1 $p = 0,002$; für HNP-3 $p = 0,02$; Kombination $p = 0,004$). Zudem führte die Kombination der 4 getesteten AMPs (Konzentration je 10 µg/ml) zu einer geringeren Überlebensrate bei dem roten Komplex alleine im Vergleich zu den einzelnen AMPs bei dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* (Abbildung 32 f-i, für LL-37 $p < 0,0001$; für HBD-2 $p = 0,002$; für HNP-1 $p < 0,0001$; für HNP-3 $p < 0,0001$).

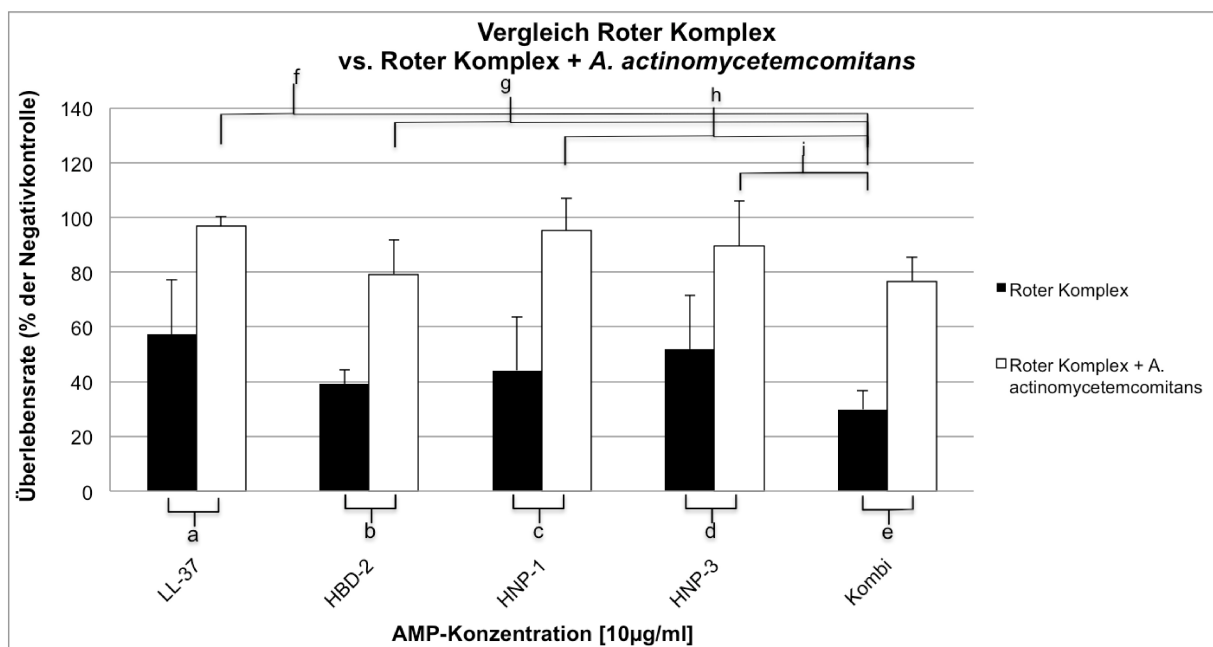


Abbildung 32: Vergleich der Überlebensrate zwischen dem Roten Komplex und Roter Komplex + *A. actinomycetemcomitans* (a $p = 0,014$; b $p = 0,013$; c $p = 0,002$; d $p = 0,02$; e $p = 0,004$; f $p < 0,0001$; g $p = 0,002$; h $p < 0,0001$; i $p < 0,0001$)

Die Überlebensrate durch die Kombination der 4 getesteten AMPs erwies statistisch signifikante Ergebnisse zwischen dem roten Komplex und der Kombination der Bakterien des roten Komplex und *P. micra*. (Abbildung 33a-d, für LL-37 $p = 0,003$; für HBD-2 $p = 0,038$; für HNP-3 $p = 0,025$; Kombination $p < 0,0001$).

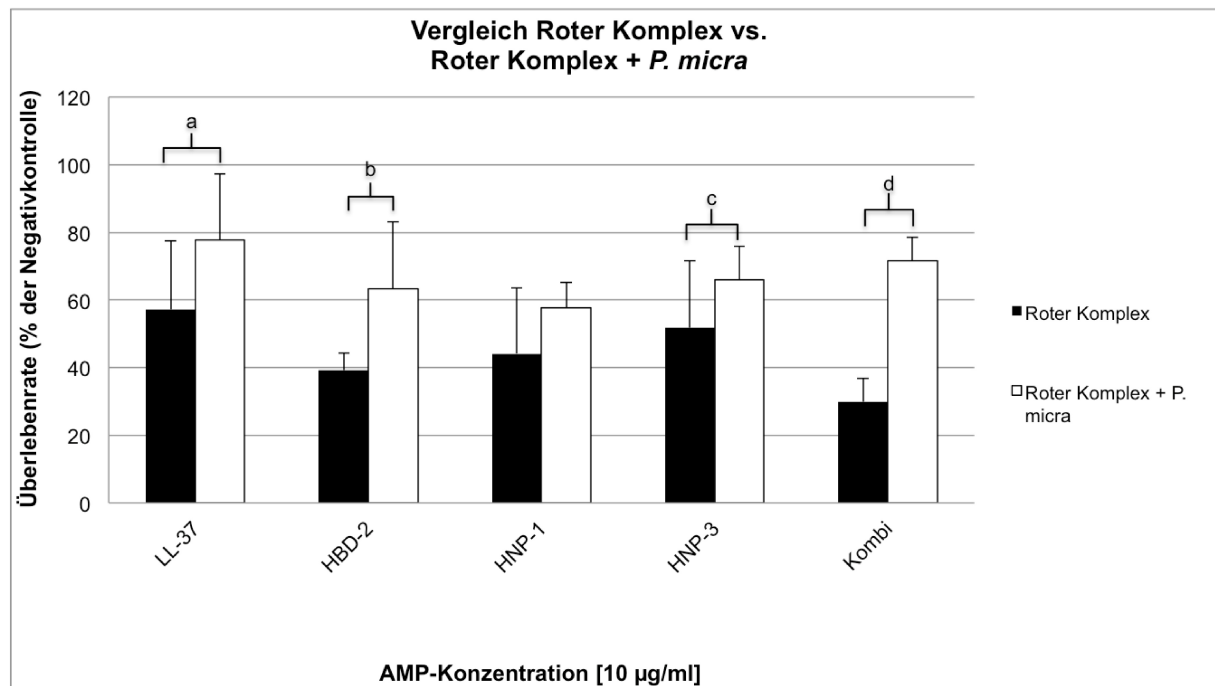


Abbildung 33: Vergleich der Überlebensrate zwischen dem Roten Komplex und dem Roten Komplex + *P. micra* (^a $p = 0,003$; ^b $p = 0,038$; ^c $p = 0,025$; ^d $p < 0,0001$)

Bei Betrachtung der Wirkung der AMPs auf die einzelnen Bakterienstämme ergaben sich folgende Signifikanzen (siehe Tabelle 4):

Die Überlebensrate der Bakterien durch die Kombination der 4 getesteten AMPs (Konzentration 10 µg/ml) erwies eine geringere Überlebensrate bei dem roten Komplex im Vergleich zu *P. micra* alleine ($p = 0,026$).

Ebenfalls war die Überlebensrate bei der Inkubation mit LL-37 auf *F. nucleatum* geringer als auf *P. micra* ($p = 0,032$).

Des Weiteren ergab sich bei der Überlebensrate durch die Kombination der 4 getesteten AMPs eine geringere Überlebensrate bei *F. nucleatum* alleine im Vergleich zu dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,011$).

Außerdem zeigte der Vergleich der Überlebensraten durch AMPs zwischen *P. intermedia* und *P. micra* statistisch signifikante Unterschiede für einen Teil der getesteten AMPs. Dabei war die Überlebensrate sowohl durch LL-37 als auch durch die Kombination der 4 getesteten AMPs für *P. intermedia* signifikant geringer als für *P. micra* ($p = 0,007$; $p = 0,017$). Ebenfalls konnte bei *P. intermedia* als auch bei *A. actinomycetemcomitans* eine geringere Überlebensrate gegenüber LL-37 festgestellt werden ($p = 0,047$).

Darüberhinaus zeigte HNP-1 und HNP-3 auf *P. micra* alleine signifikant geringere Überlebensraten als die Kombination mit dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,005$; $p = 0,039$).

Bei der Gabe von LL-37 und HNP-1 ergab sich bei *P. gingivalis* alleine eine geringere Überlebensrate als bei dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,011$; $p = 0,024$).

Auch konnte durch die Kombination der 4 getesteten AMPs (Konzentration je 10 µg/ml) eine geringere Überlebensrate bei *P. gingivalis* alleine als bei LL-37, HNP-1 und HNP-3 bei dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* erzielt werden ($p = 0,01$; $p = 0,013$; $p = 0,032$).

Zudem war die Überlebensrate bei LL-37 auf *P. intermedia* geringer als bei beiden Kombinationen aus dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* und dem roten Komplex und *P. micra* ($p < 0,0001$; $p = 0,002$).

Ebenfalls erwiesen HNP-1 und HNP-3 geringere Überlebensraten bei *P. intermedia* im Vergleich zu der Kombination aus *A. actinomycetemcomitans* und dem roten Komplex ($p = 0,001$; $p = 0,017$).

Außerdem ergab sich für HNP-1 eine niedrigere Überlebensrate bei dem roten Komplex und *P. micra* als bei dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,021$).

A.a. LL-37_10	P.i. LL-37_10	$p = 0,047$
F.n. LL37_10	P.m. LL-37_10	$p = 0,032$
P.m. LL-37_10	P.i. LL-37_10	$p = 0,007$
P.g. LL-37_10	roKo+A.a. LL-37_10	$p = 0,011$
P.i. LL-37_10	roKo+A.a. LL-37_10	$p < 0,0001$
P.i. LL-37_10	roKo+P.m. LL-37_10	$p = 0,002$
roKo_Kombination_10	P.m. Kombination_10	$p = 0,026$
F.n. Kombination_10	roKo_Kombination_10	$p = 0,011$
P.m. Kombination_10	P.i. LL37_10	$p = 0,017$
P.g. Kombination_10	roKo+A.a. LL-37_10	$p = 0,01$
P.g. Kombination_10	roKo+A.a. HNP-1_10	$p = 0,013$
P.g. Kombination_10	roKo_HNP-3_10	$p = 0,032$
P.m. HNP-1_10	roKo+A.a. HNP-1_10	$p = 0,005$
P.g. HNP-1_10	roKo+A.a. HNP-1_10	$p = 0,024$
P.i. HNP-1_10	roKo+A.a. HNP-1_10	$p = 0,001$
roKo+A.a. HNP-1_10	roKo+P.m. HNP-1_10	$p = 0,021$
P.m. HNP-3_10	roKo+A.a. HNP-3_10	$p = 0,039$

P.i._HNP-3_10	roKo+A.a._HNP-3_10	$p = 0,017$
---------------	--------------------	-------------

Tabelle 5: Übersicht über die Signifikanzen der Überlebensraten

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Testung von parodontalpathogenen Keimen gegenüber verschiedenen AMPs. Diese Studie liefert einen Beitrag zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen AMPs und parodontopathogenen Keimen. Insbesondere soll die Wirkung von AMPs einerseits von Monospezieskulturen und andererseits von Multispezieskulturen gegenüber gestellt werden und somit ein Zusammenhang zum Krankheitsbild der Parodontitis geschaffen werden.

Parodontitis ist eine Erkrankung, welche von volkswirtschaftlichem Interesse ist. Von ihr geht ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko aus die mit vielen allgemeinmedizinischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird wie z.B. Diabetes, Veränderungen des Atmungstrakts, Veränderungen der Gefäße. Die Zahnmedizin gilt im Gesundheitswesen immer noch als weitgehend isolierte Disziplin. Zahnprobleme werden überwiegend als ein ästhetisches, denn als ein gesundheitliches Problem eingestuft. Diese Blickweise verhindert nicht selten Initiativen, das Gesundheitswesen zu verbessern. Im Hinblick auf die Folgen für die Allgemeingesundheit wäre eine verbesserte parodontologische Versorgung nicht nur medizinisch sinnvoll sondern vermutlich auch ökonomisch von Nutzen. Den Zusatzkosten für mehr parodontologische Behandlungen stünden mit Sicherheit Einsparungen bei der Behandlung schwerer Allgemeinerkrankungen gegenüber.

Parodontitis ist eine autoimmune Entzündung gegen die das Immunsystem versucht anzukämpfen. Dabei stellt das gemeinsame Auftreten von Bakterien für den Körper ein besonders großes Hindernis dar. Deswegen erfolgte in dieser Studie die Auswahl der verschiedenen Bakterien nach der Pathogenität, Aggressivität und Häufigkeit des Auftretens dieser Bakterien bei einer Parodontitis. Die Gruppenkonstellationen wurden so gewählt wie sie am häufigsten in den Taschen von Parodontitis Patienten vorkommen (Holt *et al.*, 2005).

Das Hauptziel unserer Studie war die Empfindlichkeit von parodontalpathogenen Bakterien gegenüber verschiedenen AMPs zu testen. Die Ergebnisse belegen, dass bei den Monospezieskulturen mit Ausnahme von *P. gingivalis* und *P. micra* eine deutlich geringere Überlebensrate bei AMP-Konzentrationen von 10 µg/ml im Vergleich zu 1 µg/ml zu erkennen war. Bei den Multispeziesbiofilmkulturen, welche aus den Kombinationen des roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* und dem

roten Komplex und *P. micra* bestanden konnten keine signifikanten Einflüsse der Konzentration auf die Überlebensrate beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Multispezieskulturen sowie *P. gingivalis* und *P. micra* bei den Monospezieskulturen sich besonders resistent gegenüber den AMPs erwiesen. Gründe können dafür sein, dass die Bakterien Substanzen ausschalten, welche körpereigene Abwehrstoffe inaktivieren. Ein weiterer Grund für die erniedrigte Sensibilität gegenüber AMPs stellt der Biofilm dar, dessen äußere Hülle als eine physikalische und mechanische Barriere dient. Die AMPs interagieren zwar mit dem Biofilm, ein Eindringen in die Tiefe des Biofilms wird jedoch verhindert und somit auch das Abtöten der Bakterien. Des Weiteren führen die Bakterien einen genetischen Informationsaustausch untereinander durch, welcher als Quorum sensing bezeichnet wird. Dabei werden über Signalmoleküle z.B. Resistenzgene für Oberflächenantigene exprimiert mit denen AMPs nicht interagieren können. Somit sind die Bakterien unangreifbar für die AMPs. Ein weiterer Grund für eine Resistenzentwicklung im Multispeziesbiofilm ist, dass im Biofilm Nahrungsspezialisten wie *T. forsythia* und *T. denticola* leben, welche Abfallprodukte anderer Bakterien als Nahrungsquelle benötigen. In einem Monospeziesbiofilm können diese Spezialisten nur schwer überleben.

Bei Betrachtung von Keim, AMP und Konzentration ergaben sich bei *P. gingivalis* und *P. micra* relativ konstante Überlebensraten durch die verschiedenen AMPs. Im Gegensatz dazu konnte bei *F. nucleatum* und *P. intermedia* ein deutlicher Unterschied in der Überlebensrate zwischen den verschiedenen AMPs beobachtet werden. Eine Studie von Bachrach und Kollegen belegte eine Resistenzentwicklung von *P. gingivalis* gegenüber LL-37. Dabei nimmt die Aktivität von LL-37 gegenüber *P. gingivalis* einen Wert von Null an, was in der Fähigkeit der Hydrolyse von LL-37 durch *P. gingivalis* begründet liegt. Dieses Ergebnis konnte teilweise durch unsere Studie bestätigt werden. Zumindest konnte eine hohe Überlebensrate bei *P. gingivalis* nicht nur gegenüber LL-37 sondern gegenüber aller verwendeten AMPs beobachtet werden (Bachrach *et al.*, 2008; McCrudden *et al.*, 2013).

Eine andere Studie belegte eine proteolytische Inaktivierung von LL-37 (10 µg/ml) durch das Enzym Karilysin mit der Folge einer Resistenzentwicklung für Bakterien des roten Komplex, wie *P. gingivalis* und *T. forsythia* (Koziel *et al.*, 2010). Die von uns bestimmten Überlebensraten des roten Komplex durch LL-37 wiesen im Vergleich zu den anderen verwendeten AMPs eine hohe Überlebensrate von circa

70% auf. Dieses Ergebnis bestätigte somit teilweise eine schlechtere Wirksamkeit bei diesen Bakterien. Andererseits kann mit großer Wahrscheinlichkeit das nicht ganz übereinstimmende Studienergebnis an dem Enzym Karilysin liegen, welches in unserer Studie nicht verwendet wurde. Im Gegensatz dazu belegte eine Studie von Tanaka und Kollegen, dass *A. actinomycetemcomitans* mit Hilfe von LL-37 (10 µg/ml) bei einer Kontaktzeit von 60 Minuten abgetötet werden kann (Tanaka *et al.*, 2000). In unserer Studie konnte bei einer Konzentration von 10 µg/ml eine Überlebensrate von 60% erzielt werden. Somit entsteht ein Widerspruch zu der Studie von Tanaka wo die Konzentration von 10 µg/ml der letalen Dosis (LD99) entsprach.

Des Weiteren fand eine Studie von Raj und Kollegen heraus, dass *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* unempfindlich gegenüber HNP-1 und HNP-3 waren (Raj *et al.*, 2000; Miyasaki *et al.*, 1990). Unsere Ergebnisse ergaben bei *A. actinomycetemcomitans* eine Überlebensrate von circa 50% für HNP-1 und HNP-3. Allerdings konnte bei *P. gingivalis* nur eine Überlebensrate von circa 70% erreicht werden. Somit konnten mit unserer Studie die Ergebnisse von Raj und Miyasaki nur teilweise bestätigt werden.

Sowohl bei *A. actinomycetemcomitans* als auch bei *F. nucleatum* ergaben sich die geringsten Überlebensraten bei HBD-2 (10 µg/ml) mit 45% und fast 30%. Diese Werte stützten die Ergebnisse von anderen Studien, bei denen β -Defensine, wie HBD-2 und HBD-3 besonders gegen grampositive und gramnegative Bakterien, wie *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* wirkten. So war eine MIC von 25 µg/ml für *F. nucleatum* ausreichend, wohingegen für andere Bakterien wie z.B. für *Strep. mutans* eine MIC von 100 µg/ml nötig war (Feng *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009).

Eine weitere Studie von Joly und Kollegen testete die Empfindlichkeit von *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. micra* und *A. actinomycetemcomitans* gegenüber HBD-2 und HBD-3. Nur 21,4% der anaeroben Bakterien und 100% der aeroben Bakterien waren empfindlich gegenüber HBD-2. Die Minimale Hemm-Konzentration (MIC) variierte bei den Bakterien zwischen 4,5 und 250 µg/ml. HBD-3 zeigte eine bessere Wirkung gegenüber der Bakterien als HBD-2 ($p = 0,005$). Ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie von Shelburne und Kollegen hervor. In dieser war von einer Resistenzentwicklung von *P. gingivalis* und *F. nucleatum* gegenüber HBD-2 die Rede (Shelburne *et al.*, 2005; Devine *et al.*, 1999). In unserer Studie ergaben sich sowohl

bei *A. actinomycetemcomitans* als auch bei *F. nucleatum* die geringsten Überlebensraten bei HBD-2 (10 µg/ml) mit 45% und fast 30%. Wohingegen *P. gingivalis* und *P. micra* eine relativ hohe Überlebensrate durch HBD-2 und durch die anderen AMPs aufwiesen. Dieses Ergebnis entsprach somit durch die geringen Überlebensraten für *A. actinomycetemcomitans* dem Studienergebnis von Joly und Kollegen, wohingegen sich die Überlebensrate von *F. nucleatum* konträr zu den oben erwähnten Studienergebnissen verhielt. Für die Spezies *P. gingivalis* und *P. micra* konnte eine teilweise Übereinstimmung mit den anderen Studien festgestellt werden.

Des Weiteren verdeutlichte eine Studie von Ji und Kollegen, dass die MIC für LL-37 bei den Bakterien des roten Komplexes mit einer MIC von 125 µg/ml fast dreifach so hoch war, als bei *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia* (Für *P. intermedia* 15,7 µg/ml; für *A. actinomycetemcomitans* 37,8 µg/ml). LL-37 wies eine größere Resistenz gegenüber der Bakterien des roten Komplex auf als gegenüber nicht parodontalpathogener Bakterien ($p = 0,004$). Vergleicht man dieses Ergebnis mit unserer Studie, so konnte festgestellt werden, dass die Kombination der Bakterien des roten Komplex durch LL-37 eine relativ hohe Überlebensrate von circa 60% aufwies. Im Gegensatz dazu erreichte LL-37 (10 µg/ml) bei *P. intermedia* eine Überlebensrate von fast 70%. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte allerdings nur eine Überlebensrate von 60% erreicht werden. Sowohl dieses Ergebnis als auch das Studienergebnis von Ji und Kollegen verdeutlichten, dass die Bakterien des roten Komplex schwerer zu reduzieren sind als die Monospezieskulturen. Die Gründe für diese Resistenzentwicklung wurden zu Beginn der Diskussion aufgeführt (Ji et al., 2007). Im Gegensatz zu unserer Studie wurde bei Ji und Kollegen eine Inkubationszeit von 120 Minuten festgelegt.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass es keine einheitliche Wirkung eines AMPs gegenüber der Monospezieskulturen und Multispezieskulturen gibt.

Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bei sämtlichen bis jetzt vorliegenden Studien die Bakterien planktonisch kultiviert wurden und die Kultivierungszeit zum Teil nur 24 Stunden betrug. Diese Kultivierung entsprach nicht der klinischen Realität. Deswegen haben bei unserer Studie im Gegensatz zu anderen Studien die Bakterien über fünf Tage einen Biofilm auf Dentinplättchen gebildet, um möglichst realistische Bedingungen herzustellen. Dennoch ahmte dieser Versuchsaufbau nicht exakt die Verhältnisse in der Mundhöhle nach, da wichtige für

den Biofilmaufbau ausschlaggebende Bestandteile fehlten, wie zum Beispiel Blut und das Immunsystem.

Da Parodontitis eine Biofilm-assoziierte Erkrankung ist kommt für den Aufbau des Biofilms nicht nur einem einzelnen Bakterium eine große Bedeutung zu, sondern einer Kombination aus Bakterien die durch gegenseitige Unterstützung und durch ausgeschüttete Stoffwechselprodukte akkumulieren und das Zahnfleisch angreifen. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie sowohl die Wirkung von Monospezieskulturen auf AMPs als auch Multispezieskulturen getestet um Unterschiede in der Wirkung festzustellen.

Des Weiteren könnten Variationen in der Inkubationszeit der ausschlaggebende Grund für unterschiedliche Studienergebnisse sein. Während andere Studien Inkubationszeiten von bis zu 12 Stunden wählten, wurde in unserer Studie eine Inkubationszeit von einer Stunde festgelegt.

Ein weiterer beeinflussender Punkt auf die Ergebnisse stellte die Variation in der Größe der Dentinplättchen dar. Da die Plättchen von Rinderzähnen gewonnen wurden und nicht maschinell gefertigt wurden, konnte keine exakte Größengleichheit garantiert werden.

Die gewählten Konzentrationen der AMPs orientierten sich an anderen Studien. Bei der Studie von Tanaka und Kollegen wurde 10 µg/ml als letale Dosis gewählt, wodurch unsere höchste Dosis ebenfalls bei diesem Wert lag (Tanaka *et al.*, 2000). Andererseits wurde in anderen Studien die MIC zur Beurteilung der Sensibilität der Bakterien gegenüber AMPs gewählt. Hierbei wurden Konzentrationen von bis zu 250 µg/ml erreicht. Die klinische Konzentration der AMPs ist allerdings deutlich niedriger als der genannte Wert.

Beim Vergleich der Monospezieskulturen mit den Multispezieskulturen, wie *A. actinomycetemcomitans* mit der Kombination aus dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* konnten durchgehend bei *A. actinomycetemcomitans* geringere Überlebensraten beobachtet werden.

Sowohl der Vergleich der Multispezieskulturen zwischen dem roten Komplex alleine und der Multispezieskultur aus dem roten Komplex und *A. actinomycetemcomitans* als auch der Vergleich der Multispezieskulturen zwischen dem roten Komplex alleine und der Multispezieskultur aus dem roten Komplex und *P. micra* ergaben geringere Überlebensraten bei dem roten Komplex alleine. *A. actinomycetemcomitans* und *P.*

micra schienen als Spezialisten eine bedeutende Rolle im roten Komplex einzunehmen.

Die Ergebnisse verdeutlichten ebenfalls höhere Überlebensraten bei den Multispezieskulturen im Vergleich zu den Monospezieskulturen. Die Gründe für diese Entwicklung wurden zu Beginn der Diskussion erwähnt. Außerdem verstärkten die Ergebnisse die momentane Studienlage, dass der rote Komplex in Kombination mit *A. actinomycetemcomitans* besonders pathogen ist und nur schwer mit AMPs reduziert und unter Kontrolle gebracht werden kann (Ji *et al.*, 2007). Des Weiteren darf *P. micra* in seiner Wirkung nicht unterschätzt werden. Es wies einen einflussreichen Effekt auf den roten Komplex auf, was der Gruppenvergleich verdeutlichte. In einer Studie von Poulet und Kollegen konnte eine Antibiotikaresistenz von *P. micra* gegenüber Metronidazol festgestellt werden (Poulet *et al.*, 1999). Auf Grund dessen ist bei hohen Keimkonzentrationen von *P. micra* anstelle des Standardantibiotikums Amoxicillin mit Metronidazol, Amoxicillin mit Clavulansäure zu verwenden (Adam *et al.*, 2014).

Hinsichtlich der gestellten Hypothese kann festgestellt werden, dass diese in weiten Teilen akzeptiert werden kann. Es wurden signifikante Unterschiede in der Überlebensrate der Bakterien durch AMPs zwischen den Monospezieskulturen und den Multispezieskulturen festgestellt. Allerdings konnte bei den verschiedenen AMPs kein AMP gefunden werden, welches gegenüber allen Bakterien überlegen war.

Trotzdem kommen AMPs in der heutigen Zeit eine immer größere Bedeutung zu. Sie werden nicht nur als Alternative zu Antibiotika diskutiert, um sie therapeutisch als endogenes Antibiotikum einzusetzen, sondern es wird an ihnen zunehmend geforscht um therapeutisch wirksame Peptide zu erlangen, die zur Bekämpfung von Infektions- und Tumorerkrankungen dienen.

6 Zusammenfassung

Vorliegende in vitro Studie beschäftigt sich mit der Wirkung verschiedener humaner endogen vorkommenden Antimikrobiellen Peptiden (AMPs) auf parodontalpathogene Bakterien. Diese Peptide entfalten eine breite antimikrobielle Wirkung auf verschiedene pathogene Mikroorganismen. Die Parodontitis als orale Infektionskrankheit wird durch verschiedene, zumeist Kombinationen von anaeroben Bakterienspezies ausgelöst. Um die Wirkung von AMPs auf diese komplexen Systeme besser zu verstehen, wurde die Wirkung verschiedener AMPs auf Monospezieskulturen als auch auf Multispezieskulturen von parodontalpathogenen Keimen getestet und ein unterschiedliches Ansprechen der Spezies auf die AMPs untersucht.

Dazu kam ein Biofilmmodell zum Einsatz, bei dem Monospezies-Bakterienkulturen (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* und *P. micra*) als auch Multispezies-Bakterienkulturen („Roter Komplex bestehend aus *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*“, „Roter Komplex“ mit *A. actinomycetemcomitans*, „Roter Komplex“ mit *P. micra*) über fünf Tage auf bovinen Dentinplättchen als Biofilm angezüchtet wurden. Nachdem die verschiedenen AMPs (LL-37, HBD-2, HNP-1, HNP-3 und eine Kombination aller 4 AMPs) in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 5, 1 µg/ml) auf den Dentinplättchen für 60 Minuten inkubiert wurden, erfolgte das Lösen und die Ruptur des Biofilms von den Plättchen. Nach weiteren 45 Minuten wurde ein Stoffwechsel-Aktivitäts-Assay (alarBlue®-Assay) zum Nachweis der überlebenden Bakterien eingeleitet. Die Überlebensraten wurden in Prozent der Negativkontrolle anhand der Fluoreszenzwerte errechnet. Neben einer deskriptiven Darstellung der Überlebensraten wurde für die Faktoren „Konzentration“ und „Bakterienspezies“ eine ANOVA mit LSD Post-Hoc-Test durchgeführt (α -Level 0,05), um deren Einfluss auf die Überlebensrate zu untersuchen.

Mit dieser Studie konnten Unterschiede in der Wirkung verschiedener AMPs auf parodontalpathogene Monospezieskulturen und Multispezieskulturen festgestellt werden. Insbesondere für die Monospezieskulturen von *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia* ergab sich ein signifikanter Einfluss der Konzentration der verwendeten AMPs ($p = 0,002$; $\eta^2 = 0,340$). Weiterhin haben sich die Multispezieskulturen aus der Kombination zwischen dem roten Komplex und *A.*

actinomycescomitans, dem roten Komplex und *P. micra* und dem roten Komplex alleine als besonders resistent gegenüber den getesteten AMPs erwiesen. Dies zeigte sich durch die relativ hohen und gleichbleibenden Überlebensraten (ca. 80%) trotz der Zugabe von AMPs in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Ergebnisse unserer Studie verdeutlichen die Variabilität der Sensibilität von parodontalpathogenen Bakterien gegenüber AMPs. Ein Grund für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten könnte beispielsweise die in der Literatur beschriebene Inaktivierung von körpereigenen Abwehrstoffen durch Substanzen sein, die von Bakterien ausgeschüttet werden.

Unsere Studie zeigt, dass AMPs bei der Bakterienreduktion und somit bei der Abwehr parodontalpathogener Bakterien eine Rolle spielen. Weiterführende Studien auf diesem Gebiet sind allerdings nötig, um die genauen Zusammenhänge besser zu verstehen. Ein interessanter Aspekt wäre dabei die Bakterien aus den Taschentiefen und die AMPs aus dem Speichel der Parodontitis Patienten zu gewinnen, um Korrelationen zum klinischen Schweregrad der Parodontitis herzustellen. Auch könnten AMPs möglicherweise therapeutisch zum Einsatz kommen. Durch iatrogen zugeführte bereits existierende oder neu identifizierte AMPs könnten in Zukunft die körpereigenen AMPs in ihrer bakteriziden Wirkung unterstützt werden, um Parodontitis möglicherweise einzugrenzen. Als Trägermedien könnten sich Kaugummis oder Mundspüllösungen eignen.

Zusammenfassend hilft unsere Studie den Zusammenhang zwischen parodontalpathogenen Monospezieskulturen und Multispezieskulturen gegenüber AMPs zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abe T, Hara Y, Aono M. **1991**; Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. *J Periodontal Res.* 26:429-439.
2. Aberg CH, Kelk P, Johansson A. **2015**; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence.* 6:188-195.
3. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. **2003**; Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc.* 36:247-252.
4. Abiko Y, Mitamura J, Nishimura M, Muramatsu T, Inoue T, Shimono M, Kaku T. **1999**; Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 143:37-43.
5. Adam H, Biermann-Göcke S, Kardorf-Kovacs J, Scharmann C. **2014**; Mögliche Antibiotika-Dosierungen zur unterstützenden systemischen Therapie marginaler Parodontitiden. *Praxis für Labormedizin und Mikrobiologie.*
6. Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. **2001**; Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 117:106-111.
7. Armitage GC. **1999**; Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 4:1-6.
8. Bachrach G, Altman H, Kolenbrander PE, Chalmers NI, Gabai-Gutner M, Mor A, Friedman M, Steinberg D. **2008**; Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:638-642.
9. Bachrach G, Chaushu G, Zigmond M, Yefenof E, Stabholz A, Shapira J, Merrick J, Chaushu S. **2006**; Salivary LL-37 secretion in individuals with Down syndrome is normal. *J Dent Res.* 85:933-936.
10. Bals R. **2000**; Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Medizinische Klinik.* Volume 95, Issue 9, 496-502.
11. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. **1998**; Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest.* 102:874-880.
12. Bauer F, Schweimer K, Klüver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rösch P, Adermann K, Sticht H. **2001**; Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* 10:2470-2479.

13. Beck JD, Offenbacher S. **2005**; Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol.* 76:2089-2100.
14. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. **2000**; CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem.* 275:29731-29736.
15. Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. **1995**; HBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 368:331-335.
16. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB, Guthmiller JM. **2004**; Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 33:278-285.
17. Börgeson E, Lönn J, Bergström I, Brodin VP, Ramström S, Nayeri F, Särndahl E, Bengtsson T. **2011**; Lipoxin A inhibits porphyromonas gingivalis-induced aggregation and reactive oxygen species production by modulating neutrophil-platelet interaction and CD11b expression. *Infect Immun.* 79:1489-1497.
18. Brissette CA, Lukehart SA. **2002**; Treponema denticola is resistant to human beta-defensins. *Infect Immun.* 70:3982-3984.
19. Brogden KA. **2005**; Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238-250.
20. Brouwer N, Liu Q, Harrington D, Kohen J, Vemulpad S, Jamie J, Randall M, Randall D. **2005**; An ethnopharmacological study of medicinal plants in New South Wales. *Molecules.* 10:1252-1262.
21. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. **2010**; Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 58:15-25.
22. Carlsson G, Wahlin YB, Johansson A, Olsson A, Eriksson T, Claesson R, Hånström L, Henter JL. **2006**; Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia. *J Periodontol.* 77:744-751.
23. Clarke NG, Hirsch RS. **1995**; Personal risk factors for generalized periodontitis. *J Clin Periodontol.* 22:136-145.
24. Colombo AV, Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. **2006**; Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol.* 55:609-615.
25. Consensus report. **1996**; Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1:926-932.
26. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. **2005**; Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs.* 28:1062-1068.

27. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. **1995**; hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368:173-176.
28. Dale BA, Fredericks LP. **2005**; Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 7:119-133.
29. Dale BA, Krisanaprakornkit S. **2001**; Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 30:321-327
30. Darveau RP, Tanner A, Page RC. **1997**; The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* 14:12-32.
31. Davidopoulou S, Diza E, Sakellari D, Menexes G, Kalfas S. **2013**; Salivary concentration of free LL-37 in edentulism, chronic periodontitis and healthy periodontium. *Arch Oral Biol.* 58:930-934.
32. Devine DA, Marsh PD, Percival RS, Rangarajan M, Curtis MA. **1999**; Modulation of antibacterial peptide activity by products of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* spp. *Microbiology.* 145:965-971.
33. De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. **2000**; LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 192:1069-1074.
34. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. **2009**; The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 15:2377-2392.
35. Dommisch H, Vorderwülbecke S, Eberhard J, Steglich M, Jepsen S. **2009**; SELDI-TOF-MS of gingival crevicular fluid--a methodological approach. *Arch Oral Biol.* 54:803-809.
36. Doss M, White MR, Tecle T, Hartshorn KL. **2010**; Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol.* 87:79-92.
37. Dunsche A, Açı Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. **2002**; The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci.* 110:121-214.
38. Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filloon T, Kornman KS. **1993**; Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Periodontal Res.* 28:543-546.
39. Eick S, Puklo M, Adamowicz K, Kantyka T, Hiemstra P, Stennicke H, Guentsch A, Schacher B, Eickholz P, Potempa J. **2014**; Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefevre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis. *Orphanet J Rare Dis.* 27:9:148.

40. Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. **1996**; Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem.* 271:19298-19303.
41. Fearon D, Locksley R. **1996**; The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 272:50-54.
42. Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. **2005**; Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res.* 84:445-450.
43. Feucht EC, DeSanti CL, Weinberg A. **2003**; Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Acetobacterium actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells. *Oral Microbial Immunol.* 18:359-363.
44. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stähle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. **1997**; The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 272:15258-5263.
45. Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. **1993**; Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* 2:1301-1312.
46. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. **2002**; Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol.* 110:823-831.
47. Ganz T. **2003**; Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3:710-720.
48. Ganz T. **1999**; Defensins and host defense. *Science.* 286:420-421.
49. Ganz T, Lehrer RI. **1995**; Defensins. *Pharmacol Ther.* 66:191-205.
50. Ganz, T. **1987**; Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infekt Immun.* 55:568-571.
51. García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. **2001**; Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306:257-264.
52. García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. **2001**; Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 15:1819-1821.
53. Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. **2001**; Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods.* 252:131-138.

54. Goebel C, Mackay LG, Vickers ER, Mather LE. **2000**; Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides*. 21:757-765.
55. Gorr SU. **2012**; Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Front Oral Biol*. 15:84-98
56. Gorr SU, Abdolhosseini M. **2011**; Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 11:126-141.
57. Gorr SU. **2009**; Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000*. 51:152-180.
58. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. **1996**; The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*. 238:325-332.
59. Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. **2010**; Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000*. 54:15-44.
60. Hancock RE, Diamond G. **2000**; The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbial*. 8:402-410.
61. Hancock REW. **1997**; Peptide Antibiotics. *Lancet*. 349:418-422.
62. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. **2001**; Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. 276:5707-5713.
63. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, et al. **2000**; Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22:714-721.
64. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. **1997**; A peptide antibiotic from human skin. *Nature*. 387:861.
65. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. **2003**; The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol*. 120:379-389.
66. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 5., überarb. u. erw. Aufl., Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln, **2003**.
67. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. **2003**; Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*. 57:29-55.

68. Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. **1991**; Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*. 251:1481-1485.
69. Holt SC, Ebersole JL. **2005**; Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 38:72-122.
70. Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N, Udagawa N. **2013**; Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology*. 140:344-351.
71. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH, Seki M, Ouhara K, Sugai M, Taubman MA, Kawai T, Jia HP, Schutte BC, Schudy A. **2006**; Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol*. 146:218-225.
72. Hyman JJ, Reid BC. **2003**; Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol*. 30:230-237.
73. Ishihara K. **2010**; Virulence factors of Treponema denticola. *Periodontol 2000*. 54:117-135.
74. Ji S, Hyun J, Park E, Lee BL, Kim KK, Choi Y. **2007**; Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodontal Res*. 42:410-419.
75. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB Jr. **2001**; Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*. 263:211-218.
76. Joly S, Maze C, McCray PB Jr, Guthmiller JM. **2004**; Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*. 42:1024-1029.
77. Jones DE, Bevins CL. **1993**; Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett*. 315:187-192.
78. Kandler K, Shaykhiev R, Kleemann P, Kleszcz F, Lohoff M, Vogelmeier C, Bals R. **2006**; The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *Int Immunol*. 18:1729-1736.
79. Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA, Potempa J. **2010**; A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen Tannerella forsythia ATCC 43037. *Biol Chem*. 391:105-117.

80. Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW. **1992**; Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J.* 38:M174-178.
81. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, Mäntylä P. **2003**; Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.* 38:400-404.
82. Kirkpatrick B, Miller BJ. **2013**; Inflammation and Schizophrenia: *Schizophr Bull.* 39:1174-1179.
83. König J, Holtfreter B, Kocher T. **2010**; Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1. *Eur J Dent Educ.* 1:4-24
84. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. **2002**; Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:486-505.
85. Kolenbrander PE, London J. **1993**; Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 175:3247-3252.
86. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. **1997**; The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 14:33-53.
87. Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. **2010**; Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J Innate Immun.* 2:288-293.
88. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. **2000**; Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: Multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun.* 68:2907-2915.
89. Kuula H, Salo T, Pirila E. **2008**; Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 53:175-186.
90. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. **1995**; Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 63:1291-1297.
91. Lehrer RI, Ganz T. **2002**; Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 14:96-102.
92. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. **1989**; Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* 84:553-61.
93. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. **2000**; Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 13:547-558.

94. Lovegrove JM. **2004**; Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol.* 87:7-21.
95. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. **2004**; Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 39:221-227.
96. Lundy FT, Nelson J, Lockhart D, Greer B, Harriott P, Marley JJ. **2008**; Antimicrobial activity of truncated alpha-defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges. *Mol Immunol.* 45:190-193.
97. Mah TF, O'Toole GA. **2001**; Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:34-39.
98. Marsh PD. **2003**; Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 149:279-294.
99. Marsh PD. **2005**; Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 6:7-15.
100. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM. **1999**; Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.* 67:2740-2745.
101. Matzinger P. **1998**; An innate sense of danger. *Semin Immunol.* 10:399-415.
102. McCrudden MT, Orr DF, Yu Y, Coulter WA, Manning G, Irwin CR, Lundy FT. **2013**; LL-37 in periodontal health and disease and its susceptibility to degradation by proteinases present in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 40:933-941
103. Medzhitov R, Janeway C. **1997**; Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91:295-298.
104. Messana I, Cabras T, Pisano E, Sanna MT, Olianias A, Manconi B, Pellegrini M, Paludetti G, Scarano E, Fiorita A, Agostino S, Contucci AM, Calò L, Picciotti PM, Manni A, Bennick A, Vitali A, Fanali C, Inzitari R, Castagnola M. **2008**; Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 7:911-926.
105. Micheelis W. **2011**; [Oral health in Germany: an oral epidemiological outline] Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 54:1022-1026.
106. Micheelis W, Hoffmann T, Holtfreter B, Kocher T, Schroeder E. **2008**; Zur epidemiologischen Einschätzung der Parodontitislast in Deutschland - Versuch einer Bilanzierung. *DZZ.* 7.

107. Micheelis W und Schiffner U. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie [DMS IV]. Institut der Deutschen Zahnärzte [IDZ], Köln, **2006**.
108. Miyasaki KT, Bodeau AL, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. **1990**; In vitro sensitivity of oral, gram-negative, facultative bacteria to the bactericidal activity of human neutrophil defensins. *Infect Immun.* 58:3934-3940.
109. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T. **1999**; Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 87:539-543.
110. Mohamed AB, **2013**; Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *Saudi Dent J.* 25:75-82.
111. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistollic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. **2006**; Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol.* 176:2455-2464.
112. Morris AJ, Steele J, White DA. **2001**; The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J.* 191:186-192.
113. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. **2002**; Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res.* 81:845-850.
114. Na KS, Jung HY, Kim YK. **2014**; The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 48:277-286.
115. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. **1997**; Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods.* 204:205-208.
116. Nishihara T, Koseki T. **2004**; Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000.* 36:14-26.
117. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. **1998**; A Novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 213:157-167.
118. Ohta K, Makinen KK, Loesche WJ. **1986**; Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. *Infect Immun.* 53:213-220.
119. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. **2007**; Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1098:22-50.

120. Page B, Page M, Noel C. **1993**; A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol.* 3:473-476.
121. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. **1997**; Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000.* 14:216-248.
122. Page RC, Kornman KS. **1997**; The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 14:9-11.
123. Page RC, Schroeder HE. **1976**; Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 34:235-249.
124. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. **2001**; Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183:3770-3783.
125. Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA, Cortelli JR, **2013**; Influence of Periodontal Status and Periodontopathogens on Levels of Oral Human β -Defensin-2 in Saliva. *Journal of Periodontology.* 84:1445-1453.
126. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GC, Cortelli SC, Cortelli JR. **2012**; Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 57:1609-1614.
127. Piers KL, Brown MH, Hancock RE. **1994**; Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:2311-2316.
128. Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA, Ganz T. **1997**; Localization of human intestinal defensin 5 in paneth cell granules. *Infect Immun.* 65:2389-2395.
129. Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP. **1999**; Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 26:261-3.
130. Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. **2002**; Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 360:1144-1149.
131. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. **2008**; Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 23:328-335.
132. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC. **1998**; Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol.* 152:1247-1258.

133. Raj PA, Antonyraj KJ, Karunakaran T. **2000**; Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Biochem J.* 3:633-641.
134. Ramachandran P, Boontheung P, Xie Y, Sondej M, Wong DT, Loo JA. **2006**; Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 5:1493-1503.
135. Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF. Parodontologie. Farbatlant der Zahnmedizin 1. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, **2003**.
136. Rosenfeld Y, Papo N, Shay Y. **2006**; Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem.* 281:1636-1643.
137. Saitoh M, Abiko Y, Shimabukuro S, Kusano K, Nishimura M, Arakawa T, Nakashima K, Takuma T, Kaku T, Igarashi S. **2004**; Correlated expression of human beta defensin-1, -2 and -3 mRNAs in gingival tissues of young children. *Arch Oral Biol.* 49:799-803.
138. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. **2005**; Human defensins. *J Mol Med (Berl).* 83:587-595.
139. Schröder JM, Harder J. **1999**; Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:645-651.
140. Schützhold S, Holtfreter B, Hoffmann T, Kocher T, Micheelis W. **2013**; Trends in dental health of 35- to 44-year-olds in West and East Germany after reunification. *J Public Health Dent.* 73:65-73.
141. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr. **2002**; Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2129-2133.
142. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. **1997**; Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 14:158-172.
143. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. **2002**; The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol.* 169:3883-3891.
144. Scott MG, Hancock RE. **2000**; Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol.* 20:407-431.
145. Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF. **1983**; Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol.* 54:522-528.
146. Sheiham A, Netuveli GS. **2002**; Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000.* 29:104-121.

147. Shelburne CE, Coulter WA, Olguin D, Lantz MS, Lopatin DE. **2005**; Induction of {beta}-defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:183-187.
148. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. **1998**; Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14961-14966.
149. Sixou M. 2003. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Oral Dis.* 9 Suppl 1:54-62.
150. Slots J, Ting M. **1999**; *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000.* 20:82-121.
151. Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. **1986**; The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.* 13:570-577.
152. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. **1998**; Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25:134-144.
153. Socransky SS, Haffajee AD. **2005**; Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 38:135-187.
154. Socransky SS. **1979**; Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 6:16-21.
155. Song W, Shi Y, Xiao M, Lu H, Qu T, Li P, Wu G, Tian Y. **2009**; In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents.* 33:237-243.
156. Taguchi Y, Imai H. **2006**; Expression of beta-defenin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *J Periodont Res.* 41:334-339.
157. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. **1980**; Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 28:258-268.
158. Tanaka D, Miyasaki KT, Lehrer RI. **2000**; Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. *Oral Microbiol Immunol.* 15:226-231.
159. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. **2005**; Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3883-3888.

160. Teixeira E, Daniels M, Hamilton S, Schrum A, Bragado R, Jameson S, Palmer E. **2009**; Different T Cell Receptor Signals Determine CD8+ Memory Versus Effector Development. *Science*. 323:502-505.
161. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. **2006**; Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 42:180-218.
162. Thomas L, Immunsystem, In: Thomas L. (Hrsg.): Labor und Diagnose, **2012**, 8.Auflage, TH-Books-Verlag-Gesellschaft, Frankfurt/Main, Kapitel 21.
163. Tomasinsig L, Zanetti M. **2005**; The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*. 6:23-34.
164. Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond BF, Taichman NS. **1979**; Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun*. 25:427-439.
165. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. **2009**; Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 80:969-976.
166. Uitto VJ, Grenier D, Chan ECS, McBride BC. **1988**; Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun*. 56:2717-2722.
167. Valore EV, Ganz T. **1992**; Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood*. 79:1538-1544.
168. Van Dyke TE, Sheilesh D. **2005**; Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 7:3-7.
169. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. **2005**; Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol*. 76:1293-1303.
170. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. **2007**; Human b defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Peridon Res*. 42:429-437.
171. Wan M, Godson C, Guiry PJ, Agerberth B, Haeggström JZ. **2011**; Leukotriene B4/antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A4 and resolvin E1. *FASEB J*. 25:1697-1705.
172. Wang G. **2008**; Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem*. 283:32637-32643.

173. Wang G. **2007**; Tool developments for structure-function studies of host defense peptides. *Protein Pept Lett.* 14:57-69.
174. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. **1998**; Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:399-414.
175. Whitelegge JP, Zabrouskov V, Halgand F, Souda P, Bassilian S, Yan W, Wolinsky L, Loo JA, Wong DT, Faull KF. **2007**; Protein-Sequence Polymorphisms and Post-translational Modifications in Proteins from Human Saliva using Top-Down Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 268:190-197.
176. Wiebe CB, Putnins EE. **2000**; The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc.* 66:594-7.
177. Wilson M, Reddi K, Henderson B. **1996**; Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res.* 31:393-407.
178. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. **2000**; Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 24:661-671.
179. Wong L, Sissons C. **2001**; A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 46:477-486.
180. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. **2006**; Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG.* 113:135-143.
181. Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. **1983**; Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun.* 40:205-212.
182. Zanetti M. **2005**; The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol.* 7:179-196.
183. Zasloff M. **2002**; Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389-395.
184. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. **1996**; Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* 396:319-322.

8 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur von LL-37 (Wang, 2008)

Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur von HNP-3 (Hill *et al.*, 1991)

Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von HBD-2 (Bauer *et al.*, 2001)

Abbildung 4: Anaerobe Werkbank

Abbildung 5: BHI-Medium

Abbildung 6 und 7: Bebrütete Platte von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Abbildung 8 und 9: Bebrütete Platte von *Porphyromonas gingivalis*

Abbildung 10 und 11: Bebrütete Platte von *Tannerella forsythia*

Abbildung 12 und 13: Bebrütete Platte von *Prevotella intermedia*

Abbildung 14 und 15: Bebrütete Platte von *Parvimonas micra*

Abbildung 16 und 17: Bebrütete Platte von *Fusobacterium nucleatum*

Abbildung 18: *Treponema denticola*-Röhrchen

Abbildung 19: Metallständer in 6-Well-Platte mit Dentinplättchen

Abbildung 20: Dentinplättchen in 96-Well-Platten

Abbildung 21: Reduktionsschritt Resazurin in Resorufin (Brouwer *et al.*, 2005)

Abbildung 22: alamarBlue®-Platte nach abgeschlossener Reaktion

Abbildung 23: Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 24: Überlebensrate des Roten Komplex abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 25: Überlebensrate von *P. gingivalis* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 26: Überlebensrate des Roten Komplex in Kombination mit *A. actinomycetemcomitans* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 27: Überlebensrate von *F. nucleatum* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 28: Überlebensrate des *P. intermedia* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 29: Überlebensrate von *P. micra* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 30: Überlebensrate des Roten Komplex und *P. micra* abhängig von AMP und Konzentration

Abbildung 31: Vergleich der Überlebensrate zwischen *A. actinomycetemcomitans* und dem Roten Komplex + *A. actinomycetemcomitans* (^a p = 0,02; ^b p = 0,037; ^c p = 0,003; ^d p = 0,011; ^e p = 0,002; ^f p = 0,044; ^g p = 0,003; ^h p = 0,008)

Abbildung 32: Vergleich der Überlebensrate zwischen dem Roten Komplex und Roten Komplex + *A. actinomycetemcomitans* (^a p = 0,014; ^b p = 0,013; ^c p = 0,002; ^d p = 0,02; ^e p = 0,004; ^f p < 0,0001; ^g p = 0,002; ^h p < 0,0001; ⁱ p < 0,0001;)

Abbildung 33: Vergleich der Überlebensrate zwischen dem Roten Komplex und dem Roten Komplex + *P. micra* (^a p = 0,003; ^b p = 0,038; ^c p = 0,025; ^d p < 0,0001;)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Bakterien

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien

Tabelle 3: Übersicht über Aminosäuresequenzen

Tabelle 4: Bakterielle Überlebensraten der verschiedenen Bakteriengruppen nach Inkubation mit verschiedenen AMPs mit hohen und niedrigen Konzentrationen (10 µg/ml–1 µg/ml)

Tabelle 5: Übersicht über die Signifikanzen der Überlebensraten

9 **Abkürzungen**

AMPs	Antimikrobielle Peptide
APC	antigenpräsentierenden Zelle
EPS	extrazellulären polymeren Substanzen
hCAP-18	Human Cationic Antimicrobial Peptide
HNP	Human Neutrophil Peptide
HBD	Humanes β -Defensine
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
LPS	Lipopolysaccharid
MIC	Minimale-Hemm-Konzentration
MMP	Matrix-Metalloproteasen
PMN	polymorphkernige Granulozyten
TIMP	tissue inhibitors of MMP

10 Herstellungsanweisungen der Medien

BHI Medium (DSMZ-Medium Nr. 215)

Brain Heart Infusion	11,1 g
Destilliertes Wasser	300 ml

Für Flüssigkulturen von:

A. actinomycetemcomitans

P. gingivalis

F. nucleatum

P. micra

NAM Medium (ATCC Medium Nr. 1921)

Trypticase Soy Broth	12 g
Destilliertes Wasser	285 ml

Vermischen und zum Kochen bringen. Autoklavieren bei 121°C (15 min). Abkühlen auf 50°C. Hinzugabe folgender Substanzen:

Hemin-Stammlösung	300 µl
N-Acetyl-Muraminsäure-Stammlösung	300 µl
defibriertes Schafsblut	15 ml

Aseptische Anfertigung unter Gasatmosphäre bei 80% N₂, 10% CO₂, und 10% H₂.

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzung bis zum kochen und vollständiger Auflösung.

N-Acetyl-Muraminsäure-Stammlösung:

N-Acetyl-Muraminsäure	100 mg
Destilliertes Wasser	10 ml

Filtersterilisieren (0,45 µm). Lagerung in kleinen Aliquots bei -20°C.

Für Flüssigkultur von:

T. forsythia

NAM Agar (ATCC Medium Nr. 1921)

Trypticase Soy Broth	12 g
Agar	4 g
Destilliertes Wasser	285 ml

Vermischen und zum kochen bringen. Autoklavieren bei 121°C (15 min). Abkühlen auf 50°C. Hinzugabe folgender Substanzen:

Hemin-Stammlösung	300 µl
N-Acetyl-Muraminsäure-Stammlösung	300 µl
defibriertes Schafsblut	15 ml

Aseptische Anfertigung unter Gasatmosphäre bei 80% N₂, 10% CO₂, und 10% H₂.

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzen bis zum Kochen und vollständiger Auflösung.

N-Acetyl-Muraminsäure-Stammlösung:

N-Acetyl-Muraminsäure	100 mg
Destilliertes Wasser	10 ml

Filtersterilisieren (0,45 µm). Lagerung in kleinen Aliquots bei -20°C.

Für Festkultur von:

T. forsythia

PY Medium mit Pferdeserum und NAM (ATCC Nr. 1928)

Aseptische Zugabe folgender Konzentrationen zum autoklavierten PY Medium (ATCC Medium Nr. 1524 (siehe unten)): 5% steriles Hitze-inaktives Pferdeserum und 15 mcg/ml filtersterilisiertes N-Acetyl Muramic Acid.

Peptone, Bacto (BD 211677)	1,5 g
Trypticase Peptone (BD 211921)	1,5 g
Hefeextrakt	3 g
Resazurin	0,3 mg
Salz-Stammlösung	12 ml
L-Cystein-HCl	0,15 g
Destilliertes Wasser	285 ml

Vermischen und zum kochen bringen unter 80% N₂, 10% H₂, und 10% CO₂.

Autoklavieren bei 121°C (15 min). Nach Abkühlen auf 50°C Zugabe von:

Hemin-Stammlösung	300 µl
Menadione-Stammlösung (Vitamin K3)	60 µl
hitze-inaktiviertes Pferdeserum (Endkonzentration 5% v/v)	15 ml
N-Acetyl-Muraminsäure (Endkonzentration 15 µg/ml)	300 µl

Salz-Stammlösung:

CaCl ₂	75 mg
MgSO ₄	150 mg
K ₂ HPO ₄	300 mg
KH ₂ PO ₄	300 mg
NaHCO ₃	3 g
NaCl	600 mg
Destilliertes Wasser	300 ml

Vermischen von CaCl₂ und MgSO₄ in 90 ml destilliertem Wasser bis zur Auflösung.

Hinzugabe von 150 ml Wasser und der restlichen Salze. Hinzugabe von 60 ml destilliertem Wasser. Lagerung bei 4°C.

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzen bis zum Kochen und vollständiger Auflösung.

Menadione-Stammlösung:

Menadione (Vitamin K3)	50 mg
Ethanol, reinst	10 ml

Lagerung in einer braunen Flasche bei 4°C, Haltbarkeit 1 Monat.

Für Flüssigkultur von:

T. forsythia

Tryptic Soy Agar mit 5% v/v defibriniertes Schafsblut

Tryptic Soy Broth (BD 2369509)	12 g
Agar	4 g
Destilliertes Wasser	285 ml

Autoklavieren bei 121°C (15 min). Abkühlen auf ca. 50°C. Zugabe von:

defibriniertem Schafsblut (Endkonzentration 5% v/v)	15 ml
---	-------

Vermischen und Platten gießen.

Für Festkulturen von:

T. denticola

P. intermedia

Treponema denticola Medium TDM (DSMZ-Medium Nr. 909)

Brain heart infusion Broth	3,75 g
Trypticase (BD 11921)	3 g
Hefeextrakt	750 mg
Na-Thioglycolat	150 mg
L-Cystein-HCl	300 mg
L-Asparagin	75 mg
Glucose	600 mg
Agar	900 mg
Destilliertes Wasser	300 ml

Kochen der Lösung für 5 Minuten. Abkühlen auf 50 °C unter Begasung mit 80% N₂ und 20% CO₂. Autoklavieren bei 121°C (15 min). Nach Abkühlen auf 50°C Zugabe von:

Thiamin/Fettsäure-Stammlösung	13,5 ml
Kaninchenserum	6 ml

Thiamin/Fettsäure-Stammlösung:

Thiamin-Pyrophosphat	6,0 mg
NaHCO ₃	2,0 g
Destilliertes Wasser	25,0 ml
Fettsäure-Stammlösung	20,0 ml

Filtersterilisieren und Lagern bei -20°C.

Fettsäure-Stammlösung

KOH, 0,1 N	100 ml
Isobuttersäure	0,5 ml
2-Methylbuttersäure	0,5 ml
Isovaleriansäure	0,5 ml
Valeriansäure	0,5 ml

Für Flüssigkultur von:

T. denticola

PYG Medium (DSMZ-Medium Nr. 104, modifiziert)

Tryticase Peptone	1,5 g
Peptone	1,5 g
Hefeextrakt	3 g
Rindfleischextrakt	1,5 g
Glucose	1,5 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
Tween 80	0,3 ml
Cysteine-HCl	0,15 g
Resazurin	0,3 mg
Salz-Stammlösung	12 ml
Destilliertes Wasser	285 ml

Auflösen durch Kochen und anschließendes Autoklavieren (121°C, 15 min).

Nach Abkühlen Zugabe von:

Hemin-Stammlösung	300 µl
Menadione-Stammlösung (Vitamin K3)	60 µl

Salz-Stammlösung:

CaCl ₂	75 mg
MgSO ₄	150 mg
K ₂ HPO ₄	300 mg
KH ₂ PO ₄	300 mg
NaHCO ₃	3 g
NaCl	600 mg
Destilliertes Wasser	300 ml

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzen bis zum Kochen und vollständiger Auflösung.

Menadione-Stammlösung:

Menadione (Vitamin K3)	50 mg
Ethanol, reinst	10 ml

Lagerung in einer braunen Flasche bei 4°C, Haltbarkeit 1 Monat.

Für Flüssigkultur von:

P. micra

ATCC Medium Nr. 2722 Supplemented Tryptic Soy Agar

Tryptic Soy Broth	9 g
Hefeextrakt	1,5 g
L-Cystein HCl	0,15 g
Agar	4,5 g
Destilliertes Wasser	300 ml

Auflösen durch Kochen und anschließendes Autoklavieren (121°C, 15 min).

Nach Abkühlen Zugabe von:

Hemin-Stammlösung	300 µl
Menadione-Stammlösung (Vitamin K3)	60 µl

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzen bis zum Kochen und vollständiger Auflösung.

Menadione-Stammlösung:

Menadione (Vitamin K3)	50 mg
Ethanol, reinst	10 ml

Lagerung in einer braunen Flasche bei 4°C, Haltbarkeit 1 Monat.

Für Festkultur von:

P. intermedia

ATCC Medium Nr. 2722 Supplemented Tryptic Soy Broth

Tryptic Soy Broth	9 g
Hefeextrakt	1,5 g
L-Cystein HCl	0,15 g
Destilliertes Wasser	300 ml

Auflösen durch Kochen und anschließendes Autoklavieren (121°C, 15 min).

Nach Abkühlen Zugabe von:

Hemin-Stammlösung	300 µl
Menadione-Stammlösung (Vitamin K3)	60 µl

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Erhitzen bis zum Kochen und vollständiger Auflösung.

Menadione-Stammlösung:

Menadione (Vitamin K3)	50 mg
Ethanol, reinst	10 ml

Lagerung in einer braunen Flasche bei 4°C, Haltbarkeit 1 Monat.

Für Flüssigkultur von:

P. intermedia

Tryptic Soy Broth mit 5% v/v defibriniertes Schafsblut

Tryptic Soy Broth (BD 2369509)	12 g
Destilliertes Wasser	285 ml

Autoklavieren bei 121°C (15 min). Abkühlen auf ca. 50°C. Zugabe von:

defibriniertes Schafsblut (Endkonzentration 5% v/v)	15 ml
---	-------

Vermischen und Platten gießen.

Für Flüssigkultur:

P. intermedia

Medium zur Biofilmanzucht (BMM nach Wong et al., 2001)

Muzine des Schweinemagens	0,75 g
Peptone No. 3 (BD)	3 g
Trypticase (BD)	1,5 g
Hefeextrakt (BD)	1,5 g
KCl (Sigma)	0,75 g
H ₂ O	300 ml

Auflösen durch Kochen und anschließendes Autoklavieren (121°C, 15 min).

Nach Abkühlen Zugabe von:

Hemin-Stammlösung	300 µl
Menadione-Stammlösung (Vitamin K3)	60 µl
Harnstoff-Lösung	300 µl
Arginin-Lösung	300 µl

Hemin-Stammlösung:

Hemin	500 mg
K ₂ HPO ₄	1,74 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Menadione-Stammlösung:

Menadione (Vitamin K3)	50 mg
Ethanol, reinst	10 ml

Harnstoff-Lösung:

Harnstoff-Lösung	1000 µl
H ₂ O	10 ml

Arginin-Lösung:

Arginin	1742 mg
H ₂ O	10 ml

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben:

Meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Karin C. Huth danke ich für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für die gute Betreuung und Korrektur der Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Professor Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität München, dass ich diese Studie in seiner Einrichtung durchführen konnte.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. Maximilian Kollmuß für seine höchst engagierte Betreuung, seine vorbildhafte, kontinuierliche Förderung und kompetente Unterstützung während des Erstellens dieser Promotionsarbeit.

Von Herzen danke ich meinem Onkel Dieter für seine Großherzigkeit und allen, die mich seit Jahren mit großer Hingabe begleitet haben.

Dazu gehören meine Mutter Klaudia, meine Geschwister Susanne, Andrea und Michael und natürlich auch meine fürsorgliche Großmutter Marieluise.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Katharina und meinem Freund Chris für die seelische und moralische Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Wechsler, Lisa Veronika

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden auf parodontalpathogene Keime –
eine in-vitro-Studie im Biofilmmodell“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,